



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

INCIDÊNCIA DE RODENTICIDAS EM AVES DE RAPINA: ESTUDO DE
PREVALÊNCIA E POSSÍVEIS EFEITOS SECUNDÁRIOS

NOME DO AUTOR

Francisca Lopes Sendas Pereira

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva Moreira

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Dr. Fernando González González

ORIENTADOR

Dr. Fernando González González

CO-ORIENTADOR

Doutora Anabela de Sousa
Santos da Silva Moreira

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

INCIDÊNCIA DE RODENTICIDAS EM AVES DE RAPINA: ESTUDO DE
PREVALÊNCIA E POSSÍVEIS EFEITOS SECUNDÁRIOS

Francisca Lopes Sendas Pereira

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva Moreira

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Dr. Fernando González González

ORIENTADOR

Dr. Fernando González González

CO-ORIENTADOR

Doutora Anabela de Sousa
Santos da Silva Moreira

2010

LISBOA

ÀS TRÊS PESSOAS MAIS IMPORTANTES DO MUNDO,
ELAS SABEM QUEM SÃO

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa

Ao Dr. Fernando González, por toda a confiança, conhecimento e amizade.

INCIDÊNCIA DE RODENTICIDAS EM AVES DE RAPINA: ESTUDO DE PREVALÊNCIA E POSSÍVEIS EFEITOS SECUNDÁRIOS

O impacto dos rodenticidas na fauna selvagem, principalmente os anticoagulantes de segunda geração representados pelo Brodifacume e Bromadiolona, foram e são causa de inúmeros envenenamentos primários e secundários, através de ingestão directa ou pela ingestão de animais envenenados.

Alguns estudos sugerem que a exposição a doses sub-letais destes xenobióticos podem causar uma morte “indirecta”, devido a uma predisposição a diferentes tipos de trauma ou outras patologias.

Neste estudo, é valorada a possível relação entre a presença/ausência destes pesticidas anticoagulantes em animais e outras lesões indirectamente relacionadas com uma intoxicação sub-letal.

A população estudada foram todas as aves de rapina que ingressaram num centro de recuperação em Madrid, Espanha, como cadáveres ou que morreram ou foram eutanasiadas durante o seu tratamento, devido à severidade das lesões. Foi utilizado o fígado destas aves para a análise toxicológica mediante a metodologia de Cromatografia de Camada Fina (TLC) com detecção por luz UV.

Vinte das cinquenta e três aves analisadas foram positivas a estes compostos e a Bromadiolona foi detectada em 80% dos casos. Foram encontradas relações importantes entre esta positividade e algumas variáveis analisadas como certas lesões visualizadas à necrópsia e baixa condição corporal. Também foi encontrada uma relação positiva entre os animais com resíduos de rodenticida no seu organismo e a causa de ingresso, sendo o trauma contra estrutura a mais significativa.

Palavras-Chave:: Bromadiolona, Brodifacume, Aves de Rapina, Envenenamento secundário, Efeitos Sub-Letais

RODENTICIDE INCIDENCE IN BIRDS OF PREY: PREVALENCE STUDY AND POSSIBLE SECONDARY EFFECTS

The impact of rodenticides in the wildlife, mainly the second generation anticoagulant represented by Brodifacoum and Bromadiolone, has caused and still causes innumerable cases of primary and secondary poisoning, by direct ingestion or by ingestion of poisoned animals.

Some studies suggest that exposition to sub-lethal doses of these xenobiotics could cause an "indirect" fatality, due to a bigger predisposition to different kinds of trauma or other pathology.

In this study, its assess the possible relation between the presence/absence of anticoagulant pesticides in animals and other injuries not directly related with a sub lethal intoxication present in those animals.

The sample population in study was all the birds of prey that had entered in a rehabilitation centre of Madrid, Spain, already dead or that had been dead or sacrificed during the treatment, due to the severity of injuries. A thin layer chromatography (TLC) methodology has been used with UV light detection in the toxicological analysis of the liver of these birds.

Twenty of the fifty-three analyzed birds were positive to this compounds and Bromadiolone was found in 80% of the cases. Important relations were found between positive animals and some necropsy findings and poor body condition. It was also found a positive relation between the positive animals and the cause of injury, being the trauma against structure the most significant.

Key-Words: Bromadiolone, Brodifacoum, Birds of Prey, Secondary poisoning, Sub-Lethal effects

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Dados sobre envenenamento secundário por rodenticidas em Aves de Rapina Selvagens	3
3. Descrição dos Compostos Brodifacume e Bromadiolona	14
4. Métodos analíticos de detecção de Brodifacume e Bromadiolona	25
5. Ecologia das Espécies incluídas neste estudo	31
6. Desenvolvimento experimental	37
6.1. Objectivos	37
6.2. Material e Métodos	37
6.2.1. Necrópsia	38
6.2.2. Análise Química	40
6.2.3. Análise Estatística	42
6.3. Resultados	43
6.4. Discussão	50
6.5. Conclusão	63
7. Bibliografia	64
 Anexo A1	 73
Anexo A2	83
Anexo A3	84
Anexo A4	85
Anexo B	86
Anexo C	87
Anexo D	90

Índice de tabelas

Tabela 1. Toxicidade aguda por exposição oral, do brodifacume e bromadiolona em diferentes espécies de mamíferos.	15
Tabela 2. Toxicidade aguda por exposição oral do brodifacume em diferentes espécies de aves.	15
Tabela 3. Tempos de semi-vida (Tempo SV) do brodifacume e bromadiolona em diferentes espécies animais.	20
Tabela 4. Resumo da ecologia das espécies analisadas.	33
Tabela 5. Distribuição das lesões encontradas à necrópsia nos animais positivos e negativos.	47
Tabela 6. Sintomas provocados pelas alterações nos diferentes órgãos e sistemas.	59

Índice de figuras

Figura 1. Modelo conceptual da ecotoxicologia dos rodenticidas. Possíveis vias de envenenamento de aves de rapina e aves necrófagas.	3
Figura 2. Estrutura química da bromadiolona e brodifacume	14
Figura 3. Mecanismo de coagulação sanguínea em aves	16
Figura 4. Ciclo da Vitamina K e pontos de acção dos rodenticidas	17
Figura 5. Concentração plasmática em coelhos após administração intravenosa (20 µmol /kg) de warfarina e Brodifacoume	19
Figura 6. Concentração de resíduos de Brodifacoume no fígado de ratos após exposição oral de uma dose sub-letal de 0.1 mg/kg.	20
Figura 7. Concentração de resíduos de Warfarina no fígado de ratos após a ingestão de uma dose sub-letal de 1 mg/kg.	21
Figura 8. Bufo-real (<i>Bufo bufo</i>).	31
Figura 9. Coruja-das-torres (<i>Tyto alba</i>).	32
Figura 10. Bufo-pequeno (<i>Asio otus</i>).	32
Figura 11. Casal de Peneireiro comum (<i>Falco tinnunculus</i>).	32
Figura 12. Mapa de municipios da Comunidade de Madrid e respectiva densidade populacional	38
Figura 13. Fluxograma de análise realizado para detecção e identificação de Brodifacume e Bromadiolona	41
Figura 14. Mapa de distribuição dos animais analisados	44
Figura 15. Mapas de distribuição do Bufo-Real e da Coruja das Torres analisadas	45
Figura 16. Gráfico de distribuição dos animais positivos/não detectado e respectiva espécie	46
Figura 17. Gráfico de distribuição animais positivos/não detectado e causa de ingresso.	46
Figura 18. Distribuição positivo/não detectado e condição corporal	48
Figura 19. Gráfico de distribuição dos indivíduos positivos/não detectados entre as diferentes classes de idade e sexo.	49
Figura 20. Mapa de tipos de usos de solo na Comunidade de Madrid	52

Lista de Abreviaturas

ACT. Tempo de activação da coagulação
APTT. Tempo de activação parcial da Tromboplastina
CCF. Cromatografia Líquida de Camada Fina
CG. Cromatografia Gasosa
CLAR. Cromatografia Líquida de Alta Resolução
DL₅₀. Dose letal, estimada, em 50% dos animais testados
OSPT. Tempo de Protrombina
Rf. Factor de retenção
Tempo SV. Tempo de semi-vida

1. Introdução

Os pesticidas anticoagulantes são utilizados em todo o mundo, para o controlo de populações de roedores, tanto no que diz respeito a espécies domésticas (*Rattus norvegicus*, *Mus domesticus*), como em espécies silváticas em áreas de cultivo (*Microtus arvalis*, *Apodemus sylvaticus*).

Estes podem ser classificados em anticoagulantes de “primeira geração” e “segunda geração” de acordo com o período em que foram desenvolvidos e respectiva potência. O primeiro anticoagulante introduzido no mercado foi a Varfarina, após a Segunda Grande Guerra Mundial. A esta seguiram-se outros compostos como a Pindona e o Coumatetralil, que foram desenvolvidos e amplamente utilizados, principalmente, até aos anos sessenta (Gupta, 2007).

Durante os anos 1970 a 80, foram desenvolvidos os chamados anticoagulantes de segunda geração, em resposta às repetidas resistências apresentadas pelos roedores aos compostos de primeira geração. Assim, rodenticidas como o Brodifacume, Bromadiolona e o Difenacume, são mais potentes e com maior acumulação e persistência nos tecidos dos roedores (Gupta, 2007).

O facto dos rodenticidas serem tóxicos para todos os vertebrados (Brakes e Smith, 2005), torna preocupante o impacto que estes podem ter sobre populações não-alvo. Inúmeros casos de envenenamento por rodenticidas, estão descritos em humanos (World Health Organization, 1995), animais domésticos (Kohn, Weingart e Giger, 2003; Munday e Thompson, 2003), e animais selvagens (Erickson e Urban, 2004; Murray e Tseng, 2008).

Dentro da casuística de prevalência de rodenticidas na fauna selvagem, as aves de rapina, tanto nocturnas como diurnas, representam uma percentagem significativa. Sendo aves predadoras e muitas vezes necrófagas, muitas delas com um perfil de alimentação bastante amplo, pertencem a um dos grupos animais que mais frequentemente se aponta como espécies não-alvo a intoxicação secundária¹ por estes compostos (Cox e Smith, 1992).

Os estudos efectuados nesta área, apontam claramente o Brodifacume e a Bromadiolona como os compostos rodenticidas que mais vezes são assinalados como causadores de envenenamento, principalmente se falamos em

¹ Entende-se por intoxicação secundária, a que resulta da ingestão de um animal, espécie alvo ou não-alvo, que primariamente esteve exposto ao xenobiótico.

estudos realizados na Europa (Berny *et al* 1997; Erickson e Urban, 2004; Lambert *et al* 2007).

Uma questão importante nesta área, relaciona-se com a existência de possíveis efeitos sub-letais, em aves que ingeriram doses não letais destes xenobióticos. Após a revisão bibliográfica efectuada, notou-se que a grande maioria dos estudos focava-se na análise de possíveis casos de morte por envenenamento secundário a rodenticidas. No entanto ao longo dos últimos anos começou a emergir uma nova abordagem desta questão: os possíveis efeitos a médio e a longo prazo da ingestão de doses sub-letais destes xenobióticos, sem haver contudo conclusões exactas.

Partindo desta nova perspectiva, delineou-se como objectivo principal do nosso trabalho, a análise de ocorrência de Brodifacume e da Bromadiolona, em aves de rapina selvagens, tentando, nos casos de detecção positiva, relacionar este facto com os resultados das necrópsias e com a existência de possíveis efeitos sub-letais que pudessem, indirectamente, conduzir à morte das mesmas por alteração das suas funções.

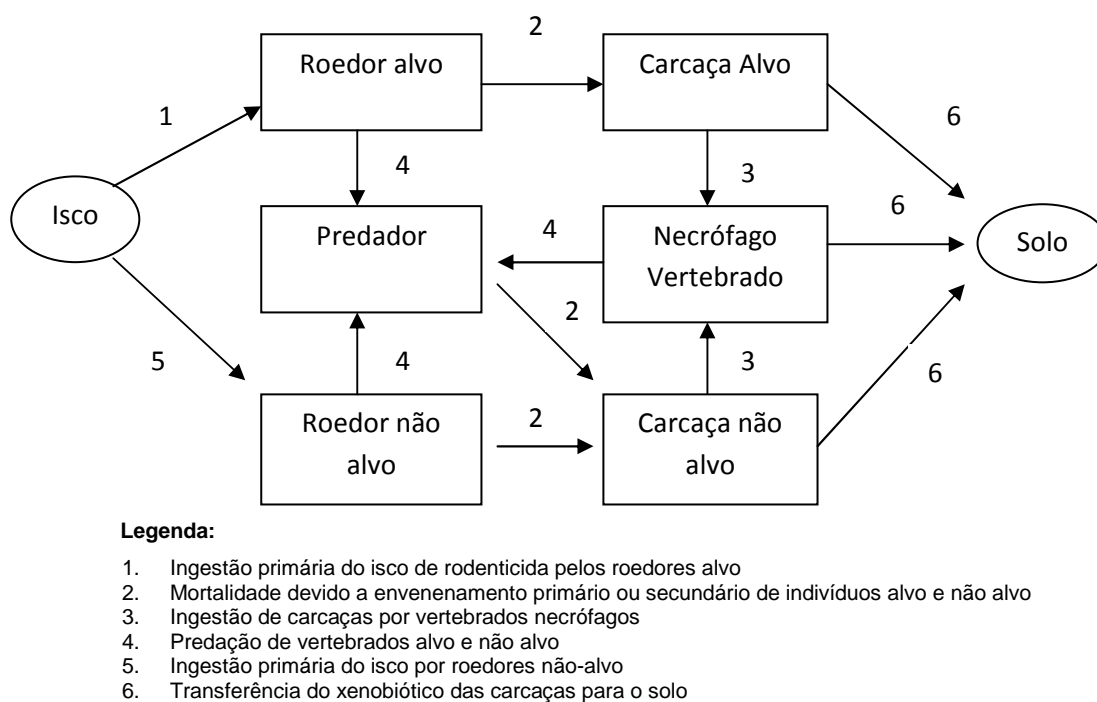
Este estudo foi realizado com aves de rapina provenientes da comunidade de Madrid, e que ingressaram no *Grupo para la Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat* (GREFA), Madrid, Espanha, entre Outubro 2008 e Abril de 2009, como cadáveres ou que durante a sua reabilitação, morreram ou foram eutanasiadas. A análise química de detecção dos xenobióticos no material biológico recolhido nestes animais, foi realizada no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

Durante o período de estágio, as actividades que me foram atribuídas consistiram na realização de primeiros auxílios e seguimento dos animais ingressados, participação em cirurgia, realização de necrópsias, participação em métodos de reabilitação, como musculação e fisioterapia dos animais e participação activa na realização das técnicas analíticas laboratoriais de detecção de xenobióticos. Os resultados preliminares obtidos até Fevereiro de 2009 foram apresentados no 11th International Congress of the European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology (Leipzig, Alemanha), na comunicação intitulada “*RODENTICIDE INCIDENCE IN BIRDS OF PREY: PRELIMINARY RESULTS OF PREVALENCE STUDY AND POSSIBLY SECONDARY EFFECTS*” (Resumo e Painel em anexo – Anexo B e C).

2. Dados sobre envenenamento secundário por rodenticidas em Aves de Rapina Selvagens

Ao longo dos anos, e em diversos países, a preocupação sobre o possível impacto dos rodenticidas e em especial os anticoagulantes de segunda geração, foi aumentando. O impacto destas substâncias nos diversos biótopos pode ocorrer a vários níveis e a proporção de indivíduos afectados depende de vários factores, que serão abordados posteriormente. Smith *et al*, (1992), elaboraram um modelo conceptual, bastante simples, da ecotoxicologia dos rodenticidas (Figura 1) que se baseia em 6 passos de transferência (1 a 6 na figura).

Figura 1 Modelo conceptual da ecotoxicologia dos rodenticidas. Possíveis vias de envenenamento de aves de rapina e aves necrófagas.



Ao analisar este modelo, podemos compreender como as aves de rapina estão expostas aos rodenticidas. Contudo o risco depende sempre da toxicidade do xenobiótico e da exposição do indivíduo. No que diz respeito à toxicidade temos que considerar: as propriedades toxicológicas do xenobiótico; concentração do xenobiótico e apresentação do mesmo; o comportamento das espécies não-alvo em risco e os factores ambientais locais. Quanto à exposição deve-se ter em conta: quais as espécies não-alvo de que se alimentam as aves predadoras nos territórios em causa; se a presa é consumida na sua totalidade ou se algumas partes do corpo são rejeitadas; onde estão concentrados os

resíduos do xenobiótico na presa; qual a quantidade de indivíduos que a ave de rapina normalmente ingere; se o resíduo presente nas presas é suficiente para causar efeitos letais ou sub-letais no indivíduo predador (Erickson e Urban, 2004).

Segundo o relatório da Divisão de Efeitos e Impacto Ambiental do Departamento de Programas de Pesticidas, EPA (Erickson e Urban, 2004), em 149 animais expostos a presas envenenadas com Brodifacume, 63 (42%) dos indivíduos morreram. Observou-se mortalidade em 11 de 20 Coruja-das-Torres (*Tyto alba*), 6 de 6 Buteo americano (*Buteo jamaicensis*) e Gavião de Ombro Vermelho (*Buteo lineatus*), 13 de 65 Quiri-quiri (*Falco sparverius*), 1 de 4 Tartaranhão Caçador (*Circus pygargus*). Não foram observadas mortes em 4 águias-reais (*Aquila chryseatus*), mas três apresentaram sintomas de envenenamento (hemorragias). Nos estudos em que examinaram os sobreviventes em busca de sinais de intoxicação, como por exemplo, hemorragias externas, hemorragias internas e/ou tempos de coagulação aumentados, em cerca de 1/3 destes exames visuais observaram-se sinais de intoxicação.

Em contraste com o Brodifacume, a exposição secundária à Bromadiolona causou morte de 9 (8%) em 118 indivíduos em 5 estudos em que foram analisadas as espécies Mocho-Orelhudo (*Bubo virginianus*), Coruja-das-Torres (*Tyto alba*), Buteo de Cauda Vermelha (*Buteo jamaicensis*) e Águia de Asa Redonda (*Buteo buteo*). Os sobreviventes também exibiam sinais de intoxicação menores do que aqueles intoxicados por Brodifacume.

Mendenhall e Pank (citado por Erickson e Urban, 2004), compararam os riscos secundários com seis anticoagulantes (três de segunda geração e outros três de primeira geração) em indivíduos da espécie Coruja-das-Torres (*Tyto alba*). Foram expostas a ratos intoxicados por Brodifacume (20 ppm), Bromadiolona (50 ppm) e Difenacume (50 ppm), 6 corujas (por rodenticida), durante 1, 3, 6 e 10 dias. Outras duas corujas (por xenobiótico) foram expostas, durante 10 dias, a ratos alimentados com Difacinona (50 ppm), Clorofacinona (50ppm) ou Fumarina (250 ppm). Seis das dezoito corujas expostas aos rodenticidas de segunda geração morreram, enquanto que nenhuma das 6 corujas expostas aos rodenticidas de primeira geração morreu ou apresentou sinais de intoxicação. O Brodifacume foi responsável pela morte de 5 das 6 corujas. A outra coruja foi morta por ingestão de ratos alimentados com Bromadiolona.

Newton *et al*, (1997), no trabalho que realizaram com Corujas das Torres (*Tyto alba*), entre 1963 e 1996, em que estudaram as causas de mortalidade

destes animais em Inglaterra, observaram que durante os 15 anos em estudo, a presença de resíduos de rodenticidas de segunda geração aumentou até que cerca de 1/3 dos animais desta espécie apresentava resíduos detectáveis de um ou mais destes compostos. Contudo apenas cerca de 3% do total de animais analisados continham resíduos no seu organismo, suficientemente elevados para causar uma morte directa por envenenamento.

Berny *et al.*, (1997) estudaram entre 1991 e 1994 em França o possível envenenamento secundário da fauna selvagem pela Bromadiolona. Concluindo que as espécies predadoras mais afectadas eram as raposas (*Vulpes vulpes*) e Águias de Asa Redonda (*Buteo buteo*), nestes últimos foi detectado Bromadiolona em 15 dos 16 animais analisados. Estas espécies alimentavam-se preferencialmente da espécie de roedor de campo (*Arvicola terrestris*) que era controlada pela Bromadiolona e foram encontrados mortos numa área em que a população destes roedores era muito elevada (> 300/hectar). Foi também detectada Bromadiolona num Milhafre Negro (*Milvus migrans*) e num exemplar de Coruja das Torres (*Tyto alba*). Os animais positivos apresentavam à necrópsia hemorragias internas. Concluindo que estas mortes se deviam a envenenamento secundário por Bromadiolona.

Howald *et al.*, (1999), analisaram entre 1994 e 1995 o impacto do Brodifacume em espécies não-alvo, após a utilização deste composto para a erradicação do *Rattus norvegicus*, de Langara Island, Canadá. Durante este estudo foram colocadas câmaras de sensores de movimento nas carcaças dos roedores, de forma a detectar que espécies animais se alimentavam das mesmas. Várias espécies de corvídeos (*Corvus corax* e *Corvus caurinus*) e águias americanas (*Haliaeetus leucocephalus*) foram fotografadas junto a essas carcaças. A importância destes roedores na dieta destes animais é desconhecida, contudo são indivíduos adaptativos, que podem tirar vantagem de uma nova fonte de presas. Foram efectuadas necrópsias aos indivíduos pertencentes às espécies de corvídeos e recolhidos os fígados para análise de rodenticidas. As águias americanas, foram capturadas e foi extraída uma amostra de sangue de cada um dos 23 indivíduos capturados, e enviado para detecção de resíduos de Brodifacume e avaliação do tempo de protrombina. Nesta última espécie foram detectados resíduos de Brodifacume em 3 indivíduos (15%) e em todos os indivíduos capturados o tempo de protombina estava significativamente aumentado tendo em conta os valores de referência (197 segundos, valor médio) tendo em conta os valores de referência (125 segundos), contudo nenhum sinal de intoxicação foi observado nestes animais. No que diz respeito aos indivíduos das espécies de corvídeos, 13 animais foram

encontrados mortos dentro da área de controlo e todos eles continham resíduos de Brodifacume no fígado (0.98 mg/kg - 1.35 mg/kg). À necrópsia, conclui-se que 69% destes animais morreram de uma grave hemorragia pulmonar e os restantes de uma hemorragia intramuscular ou intracelómica severa.

Hedgal e Blaskiewicz (1984), realizaram, um estudo de radiotelemetria com Corujas das Torres (*Tyto alba*), em quintas de Nova Jersey, com o objectivo de avaliar os riscos secundários do controlo de *Rattus spp.* e *Mus musculus* com Brodifacume. Os resultados obtidos revelaram que dos animais mortos apenas um (juvenil, electrocutado) apresentava no seu organismo resíduos de Brodifacume (< 0.05 ppm).

Apesar dos resultados deste primeiro estudo, Hedgal e Colvin (1988) conduziram nos anos seguintes, um novo estudo, com o mesmo objectivo mas desta vez realizado em Pomares de macieiras (Virginia) em que a espécie de roedor controlado foi *Microtus spp.* As espécies de aves de rapina a que foram colocados radiotransmissores foram: trinta e oito Mochos de Orelhas Americano (*Otus asio*), cinco Corujas Barrada (*Strix varia*), três Buteos de cauda vermelha (*Buteo jamaicensis*), dois Mochos-Orelhudos (*Bubo virginianus*) e dois Bufos pequenos (*Asio otus*).

Dentro destas espécies a que apresentou um maior número de indivíduos positivos foi o Mocho de Orelhas Americano (*Otus asio*). Estes animais apresentavam dentro da sua área de habitat, zonas que foram tratadas com Brodifacume. Os resultados obtidos mostram que a mortalidade, em animais que possuíam mais 20% do seu território tratado foi 58%, comparado com 17% em indivíduos com menos de 17% do seu território tratado. O envenenamento secundário foi a causa mais provável de morte nos indivíduos encontrados (tendo em conta as informações provenientes da necrópsia e a análise laboratorial para detecção de resíduos do composto). Os valores de Brodifacume encontrados nestes animais variaram de 0.4 a 0.8 ppm.

Quatro Corujas Barradas (*Strix varia*) controladas após o final do tratamento, mostraram uma predilecção por habitats de bosque e utilizavam as zonas de macieira de forma limitada; nenhum destes animais foi encontrado morto.

Um Bufo Pequeno (*Asio otus*) encontrado morto também terá sido provavelmente, vítima de envenenamento secundário, uma vez que incluía no seu território áreas tratadas, na necrópsia foram detectadas hemorragias graves e a análise dos egagrópios mostrou que estes apresentavam 0.42 ppm de Brodifacume.

Comparando estes dois estudos podemos ver que o risco de envenenamento é um processo complexo, e que depende, entre outros factores, das espécies animais em causa, dos territórios que ocupam e do tipo de alimentação específica que efectuam nesse habitat. Como se pode avaliar, nos indivíduos estudados, as Corujas das Torres (*Tyto alba*) não tinham como principal área de território as zonas tratadas com Brodifacume, nem as espécies de roedores controlados representavam uma parte significativa da sua dieta. Já os indivíduos pertencentes à espécie Bufo Pequeno (*Otus Asio*), apresentavam, na sua maioria, zonas tratadas como habitat e a espécie de roedores controlados representava a base da sua dieta. Assim se compreende a diferença entre os resultados negativos e positivos destes dois estudos e também a complexidade da exposição aos rodenticidas.

Entre 1971 e 1997, Stone *et al*, (1999) levaram a cabo um estudo de impacto dos rodenticidas anticoagulantes na fauna selvagem do Estado de Nova York. A todos os animais que na necrópsia apresentavam hemorragias ou anemia sem sinais de traumatismo ou processos parasitário/infecioso, foi recolhido o fígado e analisado para detecção de onze rodenticidas anticoagulantes. A morte por hemorragia associada a estes xenobióticos foi confirmada em 51 animais e o envenenamento secundário de aves de rapina em 26 casos, principalmente em Mocho-Orelhudo (*Bubo virginianus*) (13 animais) e Buteo de Cauda Vermelha (*Buteo jamaicensis*) (7 casos). Foram também detectados Warfarina num Falcão Peregrino (*Falco peregrinus*), Difacinona numa Coruja das Neves (*Nyctea scandiaca*), varfarina numa Águia americana (*Haliaeetus leucocephalus*), Brodifacum numa Águia-real (*Aquila chrysaetos*) e em dois Mochos de Orelhas Americanas (*Otus asio*).

Foi detectado Brodifacum no fígado ou tracto digestivo em quarenta e um casos e Bromadiolona em três. Em três dos casos foi possível relacionar os resíduos de rodenticida com o local onde sofreram a exposição: dois deles relacionados com o facto do território onde foram encontrados os animais ter sido alvo de um controlo com Brodifacume; O terceiro ocorreu num centro de recuperação em que foi dado, de forma accidental, um roedor morto por Brodifacume a um animal mantido em cativeiro, apesar deste animal por se encontrar numa instalação exterior ter podido ingerir mais roedores intoxicados.

Este mesmo autor prosseguiu depois o mesmo estudo durante os anos 1998 e 2001 (Stone *et al*, 2003). Os resultados obtidos foram semelhantes: foram detectados anticoagulantes rodenticidas em 49% de 265 aves de rapina. Estes resultados distribuíram-se por doze espécies, e foram especialmente frequentes (81%; n=53) no *Bubo virginianus*, seguidos de 45 em 78 Buteos de

Cauda Vermelha (*Buteo jamaicensis*), 18 em 50 Falcões de Tanoeiro (*Accipiter cooperii*), 10 em 22 Mochos de Orelhas Americano (*Otus asio*). Ocorreram também resultados positivos em Águias americanas (*Haliaeetus leucocephalus*), Gavião-miúdo (*Accipiter striatus*), Falcão Peregrino (*Falco peregrinus*), Águia-real (*Aquila chrysaetos*), Coruja Barrada (*Strix varia*), Mocho de Orelhas Americano (*Asio otus*), Coruja-Serra-Afiada (*Aegolius acadicus*), Urubu de cabeça vermelha (*Cathartes aura*). Brodifacume foi detectado em 84% dos casos positivos e presente em 27 dos casos em que os rodenticidas anticoagulantes foram considerados factores condicionantes de morte. A Bromadiolona foi detectado em 22%, mas apenas em 2 casos foi considerado como provável factor condicionante de morte.

Stephenson *et al*, (1999) realizaram um estudo na Nova Zelândia, com uma espécie de ave de rapina noturna (*Ninox novaeseelandiae*). Este estudo foi efectuado através da monitorização de 16 indivíduos com transmissor, após uma operação de controlo com Brodifacume do roedor *Mus musculus*, normalmente incluído na dieta destes animais. Todos os animais foram encontrados vivos passados 16 dias do início da operação. Um animal foi encontrado morto passados 22 dias, e duas carcaças de dois animais com transmissor foram localizadas no dia 51. O indivíduo encontrado no dia 22 continha 0.97 mg/kg de Brodifacume no fígado. Os outros dois indivíduos não foram analisados, contudo os autores pensam que a sua morte estaria relacionada com envenenamento secundário. Assim neste grupo de animais foi verificada uma mortalidade de 21%.

Walker *et al*, (2008) estudaram, o impacto destes compostos na Grã-Bretanha, mas desta vez em Coruja do Mato (*Strix aluco*), em dois períodos distintos, 1990-1993 e 2003-2005. Foram analisados fígados de 172 indivíduos para detecção de Difenacume, Bromadiolona, Flocoumafene e Brodifacume. A causa de morte dos animais estudados foi variada mas maioritariamente foi devido a colisões com veículos ou outros objectos (55%), inanição (17%) e traumas desconhecidos (10%). Destes animais 33 (19.2%) continham concentrações detectáveis de um ou mais destes rodenticidas. A percentagem de ocorrência foi 11.6%, 5.8% e 4.7% para Bromadiolona, Difenacume e Brodifacume, respectivamente.

Lambert *et al*, (2007) estudaram, em 2003, 58 animais provenientes de Loire Atlantique (França). Destes animais 30 eram aves de rapina: 4 Peneireiros Comum (*Falco tinunculus*), 11 Águias de asa redonda (*Buteo buteo*), 10 Corujas das Torres (*Tyto alba*), 5 Corujas do mato (*Strix aluco*); e 28 aves aquáticas: 15 Patos-reais (*Anas platyrhynchos*), 13 Galeirões-Comuns (*Fulica atra*) e 1 Galinha

de Água (*Gallinula chloropus*). Foi realizada necrópsia a todos os animais e o fígado analisado para detecção de brodifacume, bromadiolona, boumafene, coumatetralil e difenacume. Pelo menos um destes compostos foi detectado no fígado de 26 das aves examinadas (45%). Foram detectadas rodenticidas anticoagulantes em 22 das aves de rapina (73%), sendo a Águia de Asa Redonda (*Buteo buteo*) a espécie mais afectada. Apenas 4% das aves aquáticas tiveram resultados positivos. Dentro dos compostos analisados a bromadiolona foi detectada em 15 aves e o brodifacume em 4 aves.

Quando se fala de envenenamento secundário de aves de rapina, pensa-se logicamente, nos roedores como causa desse envenenamento. Contudo, não são apenas os roedores (tanto alvo como não alvo), os possíveis focos do problema. Como se sabe, muitas rapinas alimentam-se de outras aves que, como foi comprovado, podem também ser sujeitas a ingestão destas substâncias quer de forma primária ou também de forma secundária.

Na Nova Zelândia foram efectuados diversos estudos de avaliação do impacto dos rodenticidas de segunda geração, em espécies não alvo, após operações de controlo de roedores. Eason e seus colaboradores, foram os autores que mais estudos realizaram sobre esta temática neste país. Observaram que muitas espécies de mamíferos e aves eram afectadas por estas operações. Um dos grupos afectados era o dos passeriformes. Espécies como o Pardal (*Passer domesticus*), Ferreirinha-Comum (*Prunella modularis*), Melro (*Turdus merula*) e Olho-Branco (*Zosterops lateralis*), entre outros, foram vistos a ingerir isco em forma de grão, principalmente de brodifacume, e mais tarde encontrados mortos e com resíduos desse rodenticida no seu organismo (Eason e Spurr, 1995a; Eason e Spurr, 1995b; Eason *et al*, 1999; Eason *et al*, 2002; Eason *et al*, 2001).

Para além das espécies de vertebrados, novos estudos têm aprofundado o impacto em espécies de invertebrados e as implicações dos rodenticidas em envenenamento secundário ou terciário tendo como “vector” espécies de invertebrados.

Bowie e Ross (2006) realizaram um estudo com espécies de gafanhotos, na Nova Zelândia, de forma a entender como interagiam estes animais com os iscos e quantificar o risco de envenenamento secundário de aves após o consumo de gafanhotos com resíduos de rodenticidas anticoagulantes. Estes investigadores observaram que apesar de existir um baixo risco de envenenamento secundário a partir destes indivíduos, e de acordo com estudos anteriores, existe um risco superior com outras espécies de invertebrados, como espécies de caracóis (*Cantareus aspersus* e *Achatina fulica*). Também Hoare e

Hare (2006) realizaram uma revisão sobre o mesmo tema donde concluíram que os invertebrados podem representar um risco significativo de envenenamento secundário a aves. Booth *et al*, (2003), realizaram uma pesquisa com espécies de caracóis e minhocas e detectaram resíduos de brodifacume nestes animais. Estes últimos estudos demonstram que o envenenamento por rodenticidas é um acontecimento que pode envolver um habitat praticamente completo podendo afectar uma cadeia ecológica de forma muito mais significativa do que inicialmente se poderia pensar.

Após esta revisão, observamos que a grande maioria dos estudos realizados, foi efectuada tendo como objectivo a avaliação de morte directa e detecção de resíduos de rodenticidas em quantidades que fossem letais para os indivíduos em causa. Contudo na maioria dos estudos, os autores observaram que muitos dos resíduos não seriam suficientes para causar morte, embora tenham sido detectados. Este facto conduz à questão: “O que acontece aos animais que possuam no seu organismo doses sub-letais?”. Porém as informações disponíveis para a resposta a esta pergunta são escassas.

Após a análise de diversos estudos, observa-se que não existe nenhum que avalie mais aprofundadamente quais os possíveis efeitos sub-letais nas aves de rapina e chegue a uma relação entre mortes que possivelmente não estejam relacionadas com envenenamento e doses sub-letais. As informações coligidas são sumárias e resumem-se apenas a pequenas citações.

Uns dos primeiros autores a especularem sobre este tema foram Hedgal e Colvin (1988) e Lavoie (citado em Erickson e Urban, 2004, p. 99), em que referem que o stress pode ser um factor crucial na sobrevivência de animais expostos a anticoagulantes. Isto é, que os animais que estejam expostos a anticoagulantes, em situações de alteração das condições ambientais (alterações climáticas, disponibilidade de presa, defesa de territórios, escolha de parceiro para acasalamento), podem ter a sua sobrevivência condicionada.

Num caso descrito por Linthicum (citado em Erickson e Urban, 2004), envolvendo três exemplares de Águia-Real (*Aquila chryseatus*), aparentemente sãos, as aves começaram a demonstrar alterações comportamentais durante um transporte, e que acabaram por morrer. Na necrópsia foram observadas hemorragias pulmonares e cerebrais e foi detectado, após análise, brodifacume (entre 0.004 ppm e 0.026 ppm) no fígado destes animais. Pensa-se que o stress de manuseio e cativeiro, fez com que despoletasse a cadeia de efeitos do brodifacume, nestes indivíduos aparentemente sem problemas de saúde e com doses tão baixas de brodifacume no seu organismo.

Papworth (citado em Erickson e Urban, 2004), após descrever o mecanismo de envenenamento por anticoagulantes, especulou, que pequenas lesões (arranhões, hematomas, ou pequenas lesões internas) podem conduzir a hemorragias extensas e causar a morte se a coagulação não se processa adequadamente sobre a superfície lesionada. Um dos casos em que se pensa que tenha ocorrido esta cadeia de eventos, foi descrito por Stone *et al*, (1999). Neste caso um Mocho-Orelhudo (*Bubo virginianus*) foi encontrado morto, após ter sido observado durante vários dias num território tratado com brodifacume, e pensa-se que tenha sofrido uma total perda de sangue a partir de uma pequena laceração que apresentava numa das garras. Após a análise laboratorial detectou-se brodifacume no fígado (0.64 ppm). Também, e segundo Erickson e Urban (2004), foram encontradas aves de rapina mortas, após sofrerem hemorragias por pequenas lesões perfurantes nas patas (provavelmente provocadas pelas presas). No mesmo trabalho os autores referem ainda, uma ave de rapina noturna morta, aparentemente por hemorragia excessiva de uma lesão perfurante que se prolongava desde os olhos até aos seios infraorbitários. Nestes últimos casos foi detectado brodifacume, entre 0.08 ppm e 0.80 ppm.

Howald *et al*, (1999), referem aumentos nos tempos de coagulação e aumentos do tempo de protrombina em águias-americanas (*Haliaeetus leucocephalus*) após exposição a brodifacume. Primus *et al*, (2001), num estudo realizado com sete águias-reais (*Aquila chryseatus*) e clorofacinona, evidenciaram alterações do hematócrito e protrombina que indicavam sintomas de toxicidade subaguda, duas das sete águias demonstravam sintomas subletais, que os autores, infelizmente, não descrevem nem caracterizam.

Newton (citado por Erickson e Urban, 2004) também suspeitou que níveis sub-letais de rodenticidas podem predispor os animais a mortes por outras causas, como colisões, inanição, entre outras, ou podem reduzir a probabilidade de recuperação de acidentes.

Stone *et al*, (2003), referem de forma clara que hemorragias sub-letais podem interferir com a locomoção, diminuindo a sua capacidade de defesa contra traumas acidentais e ainda diminuição na actividade de predação, podendo este último efeito resultar numa nutrição inadequada que pode predispor os animais a doenças parasitárias ou infecciosas, hipotermia, entre outras. Refere ainda, citando um estudo de Kumar e Saxena, que devido ao facto de o fígado ser o órgão onde a acumulação destes compostos se efectua em maior quantidade, pode conduzir a uma lesão tóxica irreversível do mesmo, tal como foi observado em ratos expostos a uma dose média de bromadiolona de 1.25 mg/kg. Nestes animais observaram-se lesões hepáticas, nomeadamente

necrose e vacuolização dos hepatócitos, com alargamento e deformação do seu núcleo.

Para além dos efeitos anticoagulantes destes compostos, sabe-se também que mediante o antagonismo da vitamina K, podem existir outras consequências, nomeadamente a nível do metabolismo ósseo.

Sabe-se que a Vitamina K é necessária na carboxilação do ácido glutâmico, componente das proteínas ósseas como é o caso da osteocalcina, produzida pelos osteoblastos e da Proteína Matriz Gla (MGP), produzida pelos condrócitos. Estas proteínas carboxiladas possuem uma maior afinidade para o cálcio e são importantes na incorporação do mesmo no osso. Através da utilização de compostos anticoagulantes esta reacção não se processa, dando origem a proteínas não carboxiladas e portanto não funcionais (Booth e Mayer, 2000; Caraballo *et al*, 1999a).

Existem diversos estudos sobre a utilização de anticoagulantes, como a varfarina, no tratamento a longo-prazo de pacientes humanos com problemas cardíacos. São consensuais os efeitos destes compostos no desenvolvimento ósseo do embrião, onde se observam deformações ósseas, como por exemplo hipoplasia nasal, calcificação anormal e encurtamento dos ossos longos (Booth e Mayer, 2000). Também em crianças, que mantinham um tratamento com varfarina, se concluiu que havia uma redução significativa da densidade óssea (Barnes *et al*, 2005). Já no que se refere a indivíduos adultos os resultados não são concordantes (Gundberg *et al*, 1998). Contudo, alguns autores observaram a associação entre a utilização destes compostos e uma redução na densidade óssea, aumento da incidência de fracturas e osteoporose (Booth e Mayer, 2000; Caraballo *et al*, 1999a; Caraballo *et al*, 1999b).

Contudo os casos descritos em pacientes humanos são de difícil análise e aplicação neste estudo por duas razões fundamentais: os pacientes estudados apresentam características muito distintas (faixa etária, doses administradas, entre outras) e estes foram submetidos a doses muito baixas de anticoagulante por períodos de tempo prolongados.

Existem no entanto, outros estudos em ratos que tentam relacionar alterações da matéria óssea com a presença de rodenticidas anticoagulantes, nomeadamente a varfarina (Price e Sloper, 1982; Price *et al*, 1982), onde foram observadas alterações ósseas significativas.

Relativamente ao caso concreto das aves de rapina, existe apenas um estudo relativo a esta problemática. Knopper *et al*, (2007), pretenderam demonstrar, em aves de rapina, a relação entre a densidade óssea e força de

rotura e a exposição a doses sub-letais de rodenticidas anticoagulantes, nomeadamente brodifacume. Neste estudo foram analisados úmero e fémur de diversas aves de rapina intoxicadas por estes compostos. Foi concluído que não existia relação entre a intoxicação por rodenticidas anticoagulantes e uma diminuição da densidade óssea, resistência a fractura e consequentemente aumento do risco de fractura. O resultado negativo apresentado pelos autores foi discutido pelos mesmos da seguinte forma: é possível que uma depleção do cálcio nos ossos possa ser reversível assim que os níveis de vitamina K voltem ao normal. Para além disso não existe um procedimento standard para a medição da resistência e densidade óssea em aves, e como tal outros métodos de medição podem ser mais sensíveis aos efeitos dos anticoagulantes nos ossos das aves de rapina.

Tal como refere Fisher (2009), a literatura relativa a efeitos sub-letais dos rodenticidas anticoagulantes, baseia-se essencialmente em efeitos reprodutivos e teratogénicos em mamíferos, sugerindo normalmente toxicidade materna (hemorragia) conduzindo a aborto (Robinson *et al*, 2005). Existe também referenciada (Singh *et al*, 2003) uma possível redução da imunidade celular em galinhas expostas a bromadiolona, embora o ensaio não tenha sido conduzido com o rigor necessário para retirar conclusões sustentadas.

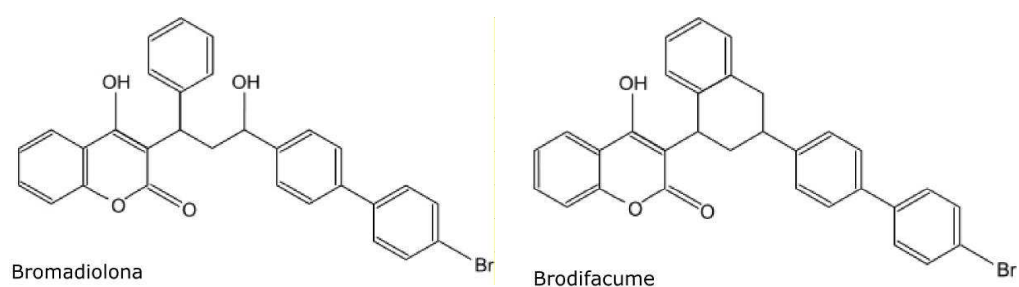
Após análise dos estudos mencionados, parece existir a possibilidade de que a exposição a doses sub-letais a estes compostos, possa estar relacionada com a presença de alterações orgânicas que ponham em risco a vida do animal. O facto de exposições secundárias estarem relacionadas com morte directa, a existência destes dados, faz com se abra uma área de estudo que deve ser aprofundada, principalmente nas aves de rapina, um dos grupos zoológicos mais afectados por estes compostos.

3. Descrição dos Compostos Brodifacume e Bromadiolona

Tal como já foi mencionado, os rodenticidas anticoagulantes podem ser classificados, de acordo com o seu período de desenvolvimento e potência, em “rodenticidas de primeira geração” e “rodenticidas de segunda geração”, estando o brodifacume e a bromadiolona incluídos neste último grupo.

Estes compostos também podem ser classificados segundo a sua estrutura química, existindo duas categorias: os rodenticidas anticoagulantes Hidroxicoumarínicos e as Indanedionas (Gupta, 2007). O brodifacume e a bromadiolona são classificados como hidroxicoumarínicos, isto é, são compostos que contêm um anel 4- hidroxicoumarínico, com diferentes ligantes na posição 3 da cadeia, de acordo com o composto em causa (Gupta, 2007).

Figura 2. Estrutura química da bromadiolona e brodifacume



A bromadiolona foi primeiramente sintetizada pela Lipha, S.A. (França), durante os anos 70. É utilizada para o controlo de roedores comensais e roedores de campo e a sua concentração no isco é geralmente de 0.05% (Gupta, 2007).

O brodifacume foi introduzido pela Sorex, Ltd. (Londres) em 1977 e desenvolvida pelo ICI (Imperial Chemicals Incorporated) sendo considerado um dos rodenticidas anticoagulantes de segunda geração mais potentes. Encontra-se disponível, geralmente, em iscos de 0.005% para roedores comensais e 0.001% para o controlo dos roedores de campo. É o único rodenticida anticoagulante capaz de produzir 100% de mortalidade na maioria das espécies de roedores após a ingestão de uma dose única (Gupta, 2007).

A DL_{50} destes compostos, ou seja, a dose estimada, que é letal em 50% dos animais testados, difere em grande medida no que se refere à espécie animal existindo em alguns casos diferenças importantes dentro da mesma (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Toxicidade aguda por exposição oral, do brodifacume e bromadiolona em diferentes espécies de mamíferos (Erickson e Urban, 2004; Stone *et al*, 2003).

Mamíferos	DL ₅₀ (mg/kg) Brodifacume	DL ₅₀ (mg/kg) Bromadiolona
Porco	0.1-2	-
Opossum	0.17	-
Coelho	0.29	1.0
Rato	0.27	1.25
Murganho	0.4	1.75
Cão	0.25-1	11-15
Ovelha	>25	-
Gato	25	>25

Tabela 2. Toxicidade aguda por exposição oral do brodifacume em diferentes espécies de aves (Godfrey, 1986)

Aves	DL ₅₀ (mg/kg)
Gaivotão- Real (<i>Larus marinus</i>)	<0.75
Ganso do Canadá (<i>Branta canadensis</i>)	<0.75
Camão (<i>Porphyrio porphyrio</i>)	0.95
Melro-Preto (<i>Turdus merula</i>)	>3
Ferreirinha-Comum (<i>Prunella modularis</i>)	>3
Codorniz da Califórnia (<i>Lophortyx californicus</i>)	3.3
Pato-Real (<i>Anas platyrhynchos</i>)	4.6
Gaivota Maori (<i>Chroicocephalus bulleri</i>)	<5.0
Pardal (<i>Passer domesticus</i>)	>6
Olho-Branco (<i>Zosterops lateralis</i>)	>6
Secretário-Pequeno (<i>Polyboroides typus</i>)	10.0
Faisão Comum (<i>Phasianus colchicus</i>)	10.0
Tadorna (<i>Tadorna variegata</i>)	>20

Na pesquisa bibliográfica efectuada, não foi possível encontrar valores de DL₅₀ para a Bromadiolona, com excepção de uma única referência para a Codorniz da Virgínea (*Colinus virginianus*), cujo valor apresentado variou entre 81 e 235 mg/kg. (Erickson e Urban, 2004).

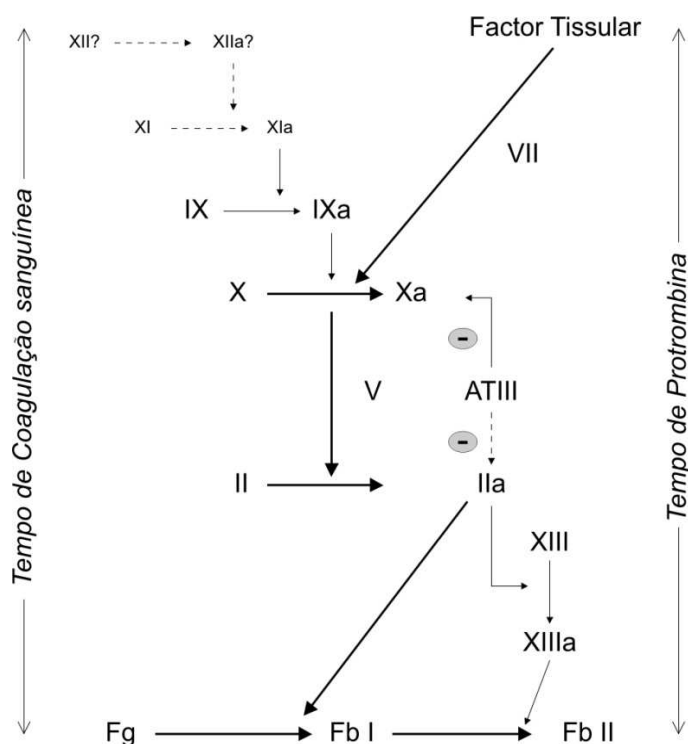
Dos valores acima descritos, muitas das espécies consideradas como mais resistentes a estes compostos, como o Pardal (*Passer domesticus*), Melro-Preto (*Turdus merula*), Olho-Branco (*Zosterops lateralis*), entre outras, foram encontradas mortas em várias operações de controlo de roedores (Eason e Spurr, 1995a). Tal facto sugere que, apesar das diferenças do desenho

experimental ser um factor preponderante neste tipo de considerações, os valores de DL₅₀ poderão ser inadequadas ou irrelevantes para previsão dos efeitos letais destes rodenticidas, sendo, talvez, mais importantes, para esta problemática, aspectos e/ou condicionantes individuais.

Mecanismo de acção

O mecanismo de acção de todos os rodenticidas anticoagulantes consiste em antagonizar, de forma indirecta, a vitamina K e portanto impedir os mecanismos de coagulação (Gupta,2007).

Figura 3. Mecanismo de coagulação sanguínea em aves (Adaptado: Feldman, 2000).

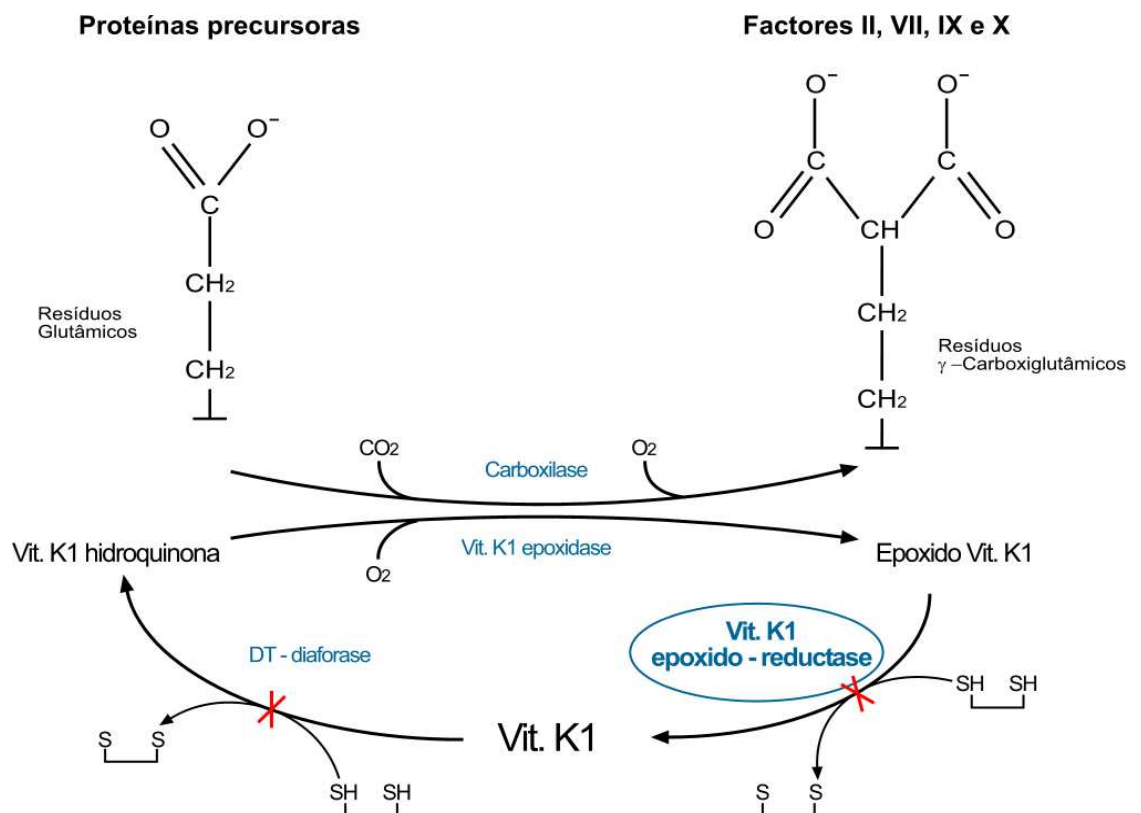


O mecanismo de coagulação nas aves difere, pouco do dos mamíferos (Figura 3). As diferenças consistem basicamente na maior importância da via extrínseca neste processo. Os trombócitos das aves parecem ter menor influência no início da coagulação, uma vez que possuem uma concentração menor de tromboplastina do que as plaquetas dos mamíferos. Estas células têm

também uma função fagocitária. Também o factor XII, não foi detectado no plasma sanguíneo das aves e a actividade do factor XI parece ser significativamente menor ou estar mesmo ausente. A precalicreína e o cininogéneo estão também ausentes (Feldman, 2000).

Na cascata de coagulação, os factores de coagulação II, VII, IX e X necessitam, para serem activados, de se ligarem ao cálcio. A capacidade para realizar esta ligação requer a conversão dos resíduos glutâmicos destes factores de coagulação, a resíduos γ -carboxiglutâmicos, através de uma reacção de carboxilação. Durante esta reacção, a vitamina K1 hidroquinona é convertida no seu metabolito biologicamente inactivo, a vitamina K1 2,3-epóxido. Esta é reduzida em vitamina K1, através da enzima epóxido redutase, que se encontra no retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos (Gupta, 2007).

Figura 4. Ciclo da Vitamina K e pontos de acção dos rodenticidas (Fonte: Gupta, 2007).



Os rodenticidas anticoagulantes produzem o seu efeito ao interferirem com a enzima Vitamina K1 epóxido reductase, conduzindo a uma depleção da vitamina K1 e consequentemente parando a síntese da Protrombina (factor II),

pró-convertina (factor VII), factor de Christmas (factor IX), factor de Stuart-Prower (factor X) prevenindo a coagulação. Assim, ocorre um aumento da concentração plasmática da vitamina K1 2,3-epóxido.

A coagulopatia clínica segue a depleção da vitamina K1 no fígado, conduzindo à morte por hemorragias diversas (Gupta, 2007). Os humanos podem tolerar até 70% de diminuição dos factores de coagulação, mantendo uma coagulação adequada. Mas por exemplo em ratos está descrito que uma diminuição de 20-30% pode conduzir a alterações significativas na coagulação (Gupta, 2007).

Cinética

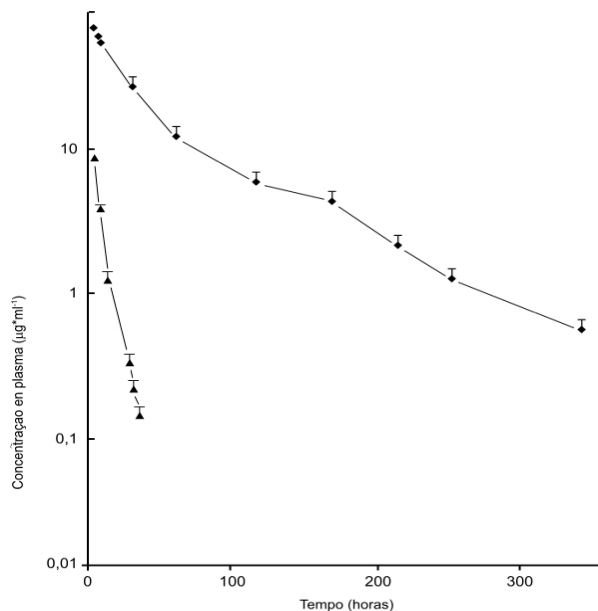
A maior potência e maior tempo de semi-vida destes compostos, comparada com os anticoagulantes de primeira geração é, segundo Gupta (2007) atribuída a:

- Maior afinidade para a Vit. K1 2.3 epoxi-reductase
- Capacidade de inibir a cascata de coagulação em mais que um ponto
- Maior acumulação hepática
- Tempos de semi-vida mais longos devido à sua solubilidade lipídica e à circulação entero-hepática

Após absorção, encontram-se concentrações elevadas destes compostos, livres no sangue, variando o tempo de semi-vida, de acordo com vários autores, entre 0.7 e 30 dias (Erickson e Urban, 2004) para o Brodifacume e 1 e 2.4 para a Bromadiolona. Esta variação, especialmente marcada no caso do brodifacume, pode estar relacionada com as diferentes doses de exposição e espécie animal estudada.

Breckenridge *et al*, (1985) concluíram que a eliminação do Brodifacume do plasma sanguíneo se realizava de forma bifásica, contrariamente à warfarina (eliminação monofásica), e com uma duração muito mais longa que esta (Figura 5).

Figura 5. Concentração plasmática em coelhos após administração intravenosa (20 $\mu\text{mol /kg}$) de warfarina e Brodifacoume. (Fonte: Adaptado de Breckenridge *et al*, 1985).



Após passagem pelo sangue, estes compostos anticoagulantes depositam-se em diversos órgãos e tecidos do organismo, sendo o local de maior concentração o fígado. Bratt e Hudson (citados por Erickson e Urban, 2004) observaram, após administração de brodifacoume radioactivo (0.25 mg/kg) em ratos, que após 10 dias cerca de 11-14% do composto tinha sido eliminado nas fezes, e que os, 74.6% que se encontravam ainda no organismo, estavam distribuídos da seguinte forma: 22.8% no fígado, 2.3% pâncreas, 0.8% no rim, 0.2 % no baço e 0.1% no coração.

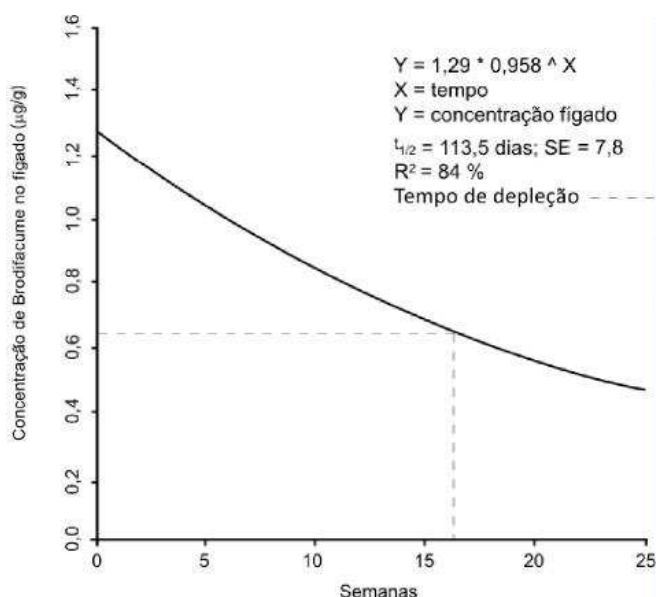
Parmer *et al*, (citado por Fisher *et al*, 2003), observaram que a cinética do brodifacoume e bromadiolona, do fígado é bifásica, com uma fase inicial rápida de distribuição e uma fase final lenta de eliminação. Os tempos de semi-vida no organismo destes compostos, apesar de longos, variam de acordo com o estudo analisado (Tabela 3).

Tabela 3. Tempos de semi-vida (Tempo SV) do brodifacoume e bromadiolona em diferentes espécies animais (Adaptado de Erickson e Urban, 2004)

Rodenticida	Espécie	Dose (mg/kg)	Tempo SV (dias)	Ref. Bibliográfica
Brodifacoume	Ratos	0.25	150-200	Bratt e Hudson (1979)
	Ovelhas	0.2-2	>128	Laas (1985)
	Ratos	0.35	130	Parmar (1987)
	Ratos	0.06	136	Belleville (1991)
	Ratos	0.2	318	Hawkins (1991)
	Possums	0.1	254	Eason (1996)
	Ratos	0.1	113.5	Fisher (2003)
Bromadiolona	Ratos	0.93	170	Parmar (1987)
	Ratos	0.2	282	Hawkins (1991)
	Ovelhas	2	256	Nelson e Hickling (1994)

Apesar desta variação, uma conclusão generalizada é que o tempo de persistência no organismo dos compostos de primeira geração, quando comparados com os compostos de segunda geração, é significativamente maior nos últimos (World Health Organization, 1995).

Figura 6. Concentração de resíduos de Brodifacoume no fígado de ratos após a exposição oral de uma dose sub-letal de 0.1 mg/kg. (Adaptado de Fisher et al, 2003).



Legenda:

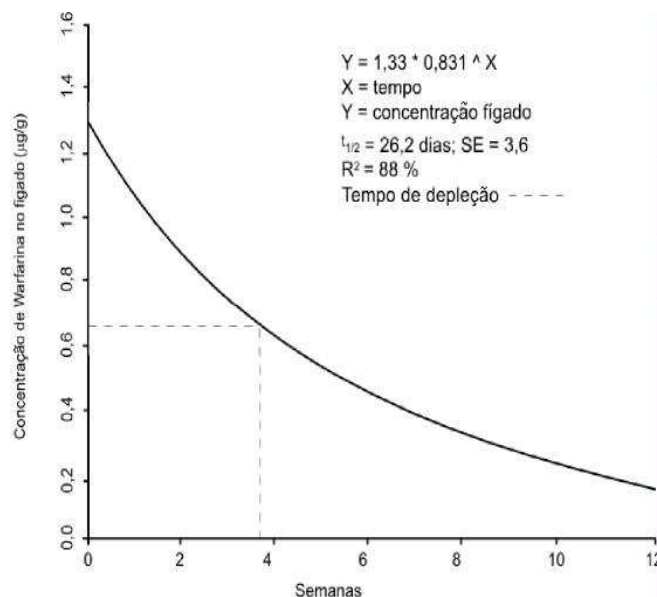
$T_{1/2}$: Tempo de semi-vida hepático do composto

SE: Erro padrão

R^2 : Proporção de variabilidade.

Fisher *et al*, (2003), realizou um estudo de análise da persistência de quatro rodenticidas anticoagulantes, no fígado de ratos controlados em laboratório. Dentro destes compostos encontravam-se o Brodifacume e a varfarina. Os resultados obtidos, apresentados nas figuras 6 e 7, demonstram claramente a diferença nos tempos de semi-vida destes dois compostos.

Figura 7. Concentração de resíduos de varfarina no fígado de ratos após a exposição oral de uma dose sub-letal de 1 mg/kg. (Adaptado de Fisher *et al*, 2003).



Legenda:
T_{1/2} = Tempo de semi-vida hepático do composto
SE= Erro Padrão
R² = Proporção de variabilidade.

Sintomatologia, Diagnóstico e Tratamento

Uma vez que o âmbito deste trabalho não engloba os casos de envenenamento agudo, apenas se realizará uma breve referência à sintomatologia, tratamento e diagnóstico laboratorial deste tipo de envenenamentos, como referido por Gupta (2007).

A **sintomatologia** deste tipo de envenenamentos é bastante inespecífica e está relacionada com a disfunção de diversos órgãos, secundária à hemorragia e hipovolémia. Os sinais clínicos podem ser morte súbita devido a hemorragia massiva, dispneia, associada a hipovolémia ou hemotórax, hematomas, e outros sintomas não específicos como anemia, depressão, hematúria, melena, entre outros.

O **diagnóstico** é baseado na história de possível exposição a rodenticidas, exame físico, avaliação laboratorial de alterações na coagulação e resposta ao tratamento específico. A determinação do tempo de protrombina (OSPT), para avaliação do factor VII, é uma das ferramentas mais importantes para o diagnóstico inicial, uma vez que este, é, dos factores de coagulação, aquele que tem um tempo de semi-vida mais curto. A análise do tempo de activação parcial da tromboplastina (APTT), é normalmente utilizado em conjunto com a determinação de OSPT para avaliação de todos os factores de coagulação, com excepção do factor VII. Como alternativa à APTT, pode ser realizado o teste de Tempo de Activação da Coagulação (ACT).

Pacientes que apresentem estes parâmetros aumentados e tempos de trombina, fibrinogénio e produtos de degradação de fibrina circulantes normais, são considerados positivos a envenenamento por rodenticidas anticoagulantes.

Estes testes não permitem contudo a identificação do composto rodenticida que afecta o paciente, importante para se atingir uma terapêutica de sucesso. Esta identificação só é possível através de técnicas analíticas, que serão sumariamente descritas mais à frente.

O **tratamento** específico para estes casos consiste na administração de Vitamina K1 (devido à sua disposição imediata para a síntese de novos factores de coagulação), que em aves está preconizado administrar-se de forma oral ou intramuscular. A sua administração será gradualmente reduzida, se durante o processo não houver alteração dos valores protrombina. Se após dois dias da finalização do tratamento o valor de OSPT se encontra normal, é parada de forma definitiva a administração de vitamina K1.

Apesar deste tratamento específico, há necessidade muitas vezes de realizar uma intervenção inespecífica de suporte de vida e/ou mitigação de efeitos: administração de eméticos, absorventes ou catárticos, concentrado de protrombina, Factor VII recombinante-activado e em caso de confirmação de hemorragia pode ser administrado plasma fresco, congelado ou sangue total.

Implicações da Cinética da Bromadiolona e Brodifacoume no Envenenamento Secundário de Predadores

Apesar da grande potência destes compostos, após a exposição a uma dose letal por via oral, os animais não sofrem uma morte imediata. Estima-se que em alguns casos, a morte possa ocorrer em 5 a 11 dias (Cox e Smith, 1992). Assim, existem alterações orgânicas e comportamentais, nos consumidores primários (Brakes e Smith, 2005; Brown e Singleton, 1998) que podem

representar um risco maior de envenenamento secundário, para espécies predadoras e necrófagas. Para além disso, o facto de não ocorrer uma morte imediata, faz com que seja possível que estes animais se continuem a expor ao xenobiótico (Sage et al, 2008) e que sejam atingidas doses, no organismo, superiores à dose letal mínima, aumentando assim os resíduos na carcaça.

Cox e Smith (1992), realizaram um estudo laboratorial, com ratos, de forma a analisarem o comportamento *ante-mortem* destes animais, após serem expostos a um rodenticida. Observaram que 48 horas após o início da experiência, todos os animais mantinham um comportamento normal, no que diz respeito às suas actividades em espaços abertos. Contudo, seis dos indivíduos já apresentavam hemorragias externas, e que o rasto de sangue que deixavam ao longo dos seus movimentos em conjunto com movimentos mais lentos e menor capacidade de resposta frente a um perigo, aumentavam a sua vulnerabilidade aos predadores. Durante as últimas 24 horas que antecederam a morte, todos os comportamentos destes animais, com excepção do tempo passado na toca, estavam alterados de forma significativa. Apesar do tempo que passavam à superfície ser menor durante este período, todos os animais se encontravam fora das tocas na fase final ante-mortem. Durante este período todos os animais apresentavam sintomas de hemorragia e com ausência de reacções de fuga. O que pressupõem que estariam mais vulneráveis à predação por aves de rapina.

Também no estudo de Brakes e Smith (2005), com espécies de roedores capturados e mantidos em laboratório, expostos a um rodenticida, foram observadas alterações comportamentais, nomeadamente resposta de fuga diminuída, por vezes com descoordenação de movimentos, e sinais de alerta diminuídos. Também neste estudo, foi referido, que as hemorragias internas provocadas por rodenticidas anticoagulantes afectavam as articulações, o que pode explicar a diminuição de mobilidade destes animais, e que o movimento para zonas abertas em vez de abrigos, tornavam mais vulneráveis à predação. Ao exame post-mortem, muitos dos roedores revelaram hemorragias cerebrais, o que pode explicar estas alterações comportamentais.

Para além de se saber que os animais lesionados e com comportamentos alterados são seleccionados por predadores (Cicero, citado por Brakes e Smith, 2005), pensa-se que estes podem desenvolver um padrão de captura para roedores com alterações comportamentais induzidas por rodenticidas, podendo aumentar a ingestão de animais contaminados.

Sage *et al*, (2008) observaram que após um controlo com Bromadiolona 94% dos roedores capturados à superfície e 67% indivíduos capturados em

tocas, continham resíduos deste composto. Todos os animais que foram encontrados moribundos ou mortos encontravam-se à superfície, 41% de *Microtus arvalis* e 20% de *Arvicola terrestris*, e todos eles continham resíduos detectáveis de bromadiolona no organismo. Neste estudo concluiu-se que o risco de envenenamento secundário para predadores que preferem caçar animais vivos, era superior entre o dia 6 e 7 das observações, mas mantinha-se durante toda o tempo de análise. Já para necrófagos de superfície, o risco estaria limitado entre o dia 4 e 12 da experiência quando foi identificada morte em animais de ambas as espécies, encontrados à superfície. Face ao resultado, os autores concluíram que existe um risco importante de envenenamento secundário de espécies não-alvo durante os primeiros 15-20 dias, e que pode ser prolongado a períodos muito mais longos (durante pelo menos 135 dias), após uma operação de controlo similar à analisada neste estudo. Esta persistência tão elevada pode ter como causa, não só a persistência do tóxico no organismo dos roedores, mas também re-colonizações das áreas controladas, por novas populações de roedores, que iniciam um novo processo de envenenamento.

Os estudos analisados para além de mostrarem que estes roedores representam um problema grave de envenenamento secundário de predadores, devido à sua maior vulnerabilidade, levantam também o problema da bioacumulação destes compostos, não só nos roedores mas também nas espécies predadoras, sendo a bioacumulação definida, neste caso, como a acumulação em rede, de um contaminante, num organismo, seja qual for a fonte de origem deste composto. Assim, compreende-se que os predadores não necessitem ingerir um número elevado de animais contaminados, num período de tempo curto, para atingirem doses que provoquem efeitos adversos no seu organismo.

4 Métodos analíticos de detecção de Brodifacoume e Bromadiolona

Existem diversas técnicas analíticas para detecção de rodenticidas anticoagulantes, entre elas a Cromatografia de Camada Fina (CCF), do anglosaxónico *Thin Layer Chromatography* – TLC (Rengel e Friedrich, 1993), a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAR), do anglosaxónico *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC (Jones, 1996), Cromatografia Gasosa, do anglosaxónico *Gas Chromatography* – GC, o Imunoensaio, entre outras. São também diversas as matrizes orgânicas onde estas técnicas são aplicadas, sendo o fígado o órgão mais utilizado uma vez que como já foi descrito, é o local de maior armazenamento destas substâncias. Contudo são também utilizados na análise, sangue total (Guan *et al*, 1999), plasma e soro sanguíneo (Palazoglu *et al*, 1998), rins, iscos (Rengel e Friedrich, 1993), entre outros.

Neste trabalho se realizará uma breve descrição, com base na revisão bibliográfica realizada (Hernández e Pérez, 2002; Khandpur, 2007), das três primeiras técnicas mencionadas, uma vez que são as mais utilizadas na detecção destes compostos, sendo destacada a CCF, método analítico utilizado neste trabalho.

Cromatografia Líquida de Camada Fina (CCF)

As primeiras referências a esta técnica datam dos anos cinquenta, contudo foi evoluindo, tornando-se numa das técnicas mais utilizadas na separação de compostos. É utilizado num número extenso de campos nomeadamente na detecção de pesticidas.

Este processo envolve um adsorvente (fase estacionária), um solvente ou mistura de solventes (fase móvel) e os compostos presentes na amostra. Esta técnica baseia-se numa migração diferencial dos diferentes compostos presentes na amostra, à medida que a fase móvel ascende sobre a fase fixa

Fase estacionária

No caso específico da CCF o adsorvente encontra-se impregnado em placas, usualmente de vidro, poliestér ou alumínio.

Os materiais mais utilizados como fase estacionária são o gel de sílica, alumina, celita, poliamida e celulose. Dentro destes o mais utilizado é o gel de sílica, devido às suas características de porosidade (diâmetro médio dos poros: 6nm), resistência ao fluxo, tamanho das partículas (5- 17 µm), espessura da placa (0.25 mm), entre outras.

O mecanismo de separação predominante com a utilização do gel de sílica é a adsorção. As zonas activas deste adsorvente consistem nos grupos silanol (Si-O-H) superficiais que possui. Estes grupos vão interagir com os componentes do fluido que banha a sua superfície. Apesar da adsorção ser o mecanismo de separação predominante neste tipo de cromatografia, também, e de acordo com a fase estacionária e compostos que se pretender separar, podem utilizar-se fenómenos de partição, trocas iónicas, exclusão molecular e afinidade.

Fase móvel

A selecção da fase móvel é também um passo importante na realização desta técnica.

Para a eleição do solvente ou mistura de solventes deveremos ter em conta uma série eluotrópica. Uma série eluotrópica consiste numa lista de dissolventes ordenados conforme a sua capacidade relativa de mover os solutos de um adsorvente dado. Tomando como exemplo o gel de sílica, o poder de eluição diminui na seguinte ordem:

Água> metanol> acetona> acetato de etilo> clorofórmio> benzeno> ciclohexano> hexano

Assim sendo a fase estacionária e os compostos a separar, assim como as propriedades inerentes dos solventes, são factores a ter em conta aquando da eleição dos mesmos.

Aplicação da amostra

A aplicação da amostra é um dos passos mais importantes na realização desta técnica.

Uma pequena quantidade da amostra (variável entre 1-5 µg/µL é a quantidade mais vezes descrita) é colocada na parte terminal da placa, designada zona de partida, repetidas vezes de forma a conseguir um ponto de aplicação o mais pequeno e concentrado possível, sem que se perda a integridade da placa. O ponto ou conjunto de pontos aplicados deve ocupar o menor diâmetro possível, uma vez que à medida que se processa a migração, as

áreas ocupadas pelos compostos tendem a ser maiores, o que pode conduzir a uma dificuldade de interpretação.

Após a aplicação, a placa de CCF é colocada na câmara de eluição, onde se encontra uma pequena quantidade de solvente ou mistura de solventes (fase móvel). A partir deste momento começa a migração da fase móvel, de forma ascendente e devido a forças de capilaridade, sobre a fase fixa, transportando consigo os compostos presentes na amostra, que irão migrar a diferentes ritmos. A esta fase denomina-se “desenvolvimento do cromatograma”.

Quando a fase móvel migra uma distância adequada e, previamente determinada, a placa de CCF é retirada e rapidamente seca, para posterior visualização do resultado.

Para além deste tipo de desenvolvimento ascendente, existem modalidades descendentes, bidimensionais e radiais.

Deteção

O método mais comum de deteção das manchas originárias da separação é a aplicação de luz ultra-violeta sobre a placa. Na maioria das vezes a placa utilizada contém um material fluorescente, cuja emissão é inibida pela maioria dos solutos. Assim após a aplicação de luz UV as manchas dos solutos aparecem mais escuras, enquanto que a placa aparece brilhante.

Outros métodos de deteção que podem ser utilizados após a aplicação de luz UV ou de forma independente, são a aplicação de substâncias que provocam uma reacção química, que pode ser específica para um determinado composto da amostra. Substâncias como ácido sulfúrico, fluoresceína entre muitos outros, são utilizadas para a deteção de um grande número de compostos.

Avaliação do Cromatograma

Para uma avaliação qualitativa do cromatograma, a localização da substância na placa é muitas vezes suficiente.

Um dos factores de avaliação da migração denomina-se factor de retenção (Rf) determinado pela seguinte equação:

$$R_f = \frac{\text{Distância de migração do composto desde a origem}}{\text{Distância do solvente desde a origem}}$$

Os valores de R_f variam entre 0 e 1. Estes valores devem ser orientativos, uma vez que a sua reprodução nem sempre é exacta. Este valor varia com: a saturação da câmara, o tipo e concentração do solvente, temperatura, natureza e tamanho da placa, preparação da amostra, direcção do fluxo da fase móvel, entre outras.

Um método eficaz para a análise qualitativa de um composto, é comparar o R_f de um composto desconhecido com um R_f de uma substância padrão, realizando corridas paralelas.

Para a realização de processos quantitativos é necessário recorrer a outro tipo de métodos físicos ou químicos adequados, como por exemplo a espectrometria de massa.

CCF a detecção de Brodifacoume e Bromadiolona

Com o desenvolvimento de outros métodos de detecção mais sensíveis, o número de citações sobre a utilização desta técnica para detecção destes compostos é escassa. Contudo e devido à sua facilidade de utilização e preço baixo da análise continua a ser aplicada principalmente como fase preparatória, para detecção de Bodifacoume e Bromadiolona, podendo, posteriormente, utilizar-se outras técnicas mais sensíveis para confirmação qualitativa ou análise quantitativa destes compostos.

Cromatografia Líquida de Alta Pressão (CLAR)

A Cromatografia Líquida de Alta Pressão foi desenvolvida no início da década de sessenta. Esta técnica baseia-se na separação dos componentes de uma mistura através da sua distribuição diferencial entre uma fase móvel (líquida) e uma fase estacionária (sólida), tal como ocorre na CCF. Contudo neste caso a fase estacionária encontra-se disposta sob a forma de pequenas partículas, em colunas, através das quais a fase móvel flui sob alta pressão, mediante um processo instrumentalizado.

CLAR na detecção de Brodifacoume e Bromadiolona

Após revisão bibliográfica, observamos que a CLAR de fase reversa com detecção UV ou por fluorescência é uma das técnicas mais vezes referida na detecção destes compostos, sendo considerada uma das mais eficazes.

Está descrita a aplicação desta técnica em diversos tipos de matrizes, nomeadamente fígado, sangue total, soro sanguíneo, plasma sanguíneo, conteúdo digestivo, bem como outro tipo de matérias, como é o caso dos iscos.

A nível de tipos de colunas e fases móveis utilizadas, observamos que as colunas C18 (cadeias de 18 átomos de carbono) são as mais utilizadas, se bem que existem alguns casos de detecção positiva com colunas C8 (cadeias de 8 átomos de carbono). Existe uma grande variedade de tipos de fases móveis aplicadas contudo em praticamente todos os casos analisados, são utilizados os chamados gradientes de eluição (altera-se a composição da fase móvel durante o desenvolvimento da análise, com o objectivo de aumentar a eficiência da separação). Dentro dos solventes mais vezes descritos encontram-se o metanol, o acetonitrilo e o acetato de amónio.

No que diz respeito à sensibilidade de análise da CLAR comparada com a CCF, Rengel e Friedrich (1993), levaram a cabo um estudo em que analisaram tecidos (fígado, conteúdo digestivo e soro sanguínea) e iscos de animais suspeitos de envenenamento por rodenticidas anticoagulantes. Das 5 amostras de fígado analisadas, nenhuma se apresentou positiva a CCF enquanto que quando analisadas com CLAR de fase reversa com detector de fluorescência 4 foram positivas. O mesmo ocorreu com a amostra de soro sanguínea analisada. Os únicos resultados positivos similares apareceram nas amostras de isco. Assim, estes autores concluíram que a técnica de CLAR aplicada, surge como um método mais sensível para determinação de pequenas quantidades destes compostos.

Nos últimos anos observou-se o desenvolvimento de técnicas de análise em que conjuga a CLAR com espectrometria de massa (Mareck e Koskinen, 2007; Vandenbroucke *et al*, 2008). Com a aplicação destes métodos atingem-se limites de detecção mais baixos e uma precisão na identificação dos compostos superior.

Cromatografia Gasosa (CG)

A cromatografia gasosa é uma técnica analítica de separação de compostos baseada primariamente na volatilidade dos mesmos, isto é, na diferença no equilíbrio líquido-vapor dos diferentes compostos da amostra.

Certas propriedades dos gases, quando comparadas com os líquidos, determinam as características e diferenças entre Cromatografia Gasosa e Líquida:

- As interações entre as moléculas dos gases, ao contrário dos líquidos, são normalmente pequenas. Por isso, na GC, a fase móvel não interage com as moléculas da amostra, tendo como única função o transporte da amostra através da coluna.
- Os gases têm um poder de difusão superior aos líquidos, o qual influi na resolução e velocidade de separação. Assim, a velocidades óptimas da fase móvel, a resolução é superior no caso da cromatografia líquida. Contudo a velocidade de separação é superior no caso da Cromatografia Gasosa.
- A maior densidade dos líquidos comparativamente aos gases, permite a utilização da gravidade ou força centrífuga como força motriz da fase móvel, enquanto que a pequena viscosidade dos gases permite a utilização de colunas mais compridas.

CG na detecção de Brodifacoume e Bromadiolona

Esta técnica não possui a mesma dimensão na detecção de rodenticidas anticoagulantes como assume a CLAR. Quando utilizada aparece normalmente associada à espectrometria de massa (Maurer e Joachim, 1998).

5. Ecología das espécies incluídas neste estudo

Os animais analisados pertencem a diferentes espécies de aves de rapina da fauna ibérica, limitadas às que ingressaram no GREFA no período em que foi desenvolvido este estudo. Na tabela 4 são descritas as espécies incluídas no estudo.

Os aspectos da dieta e habitat destas espécies animais, tal como referido anteriormente, influem na exposição ao envenenamento por rodenticidas.

Um aspecto importante na ecologia de uma espécie animal é a amplitude do seu espectro alimentício. Este vai ser determinado pelas disponibilidades do meio e também pelas tendências próprias da espécie que são o reflexo das suas características morfológicas, fisiológicas e também “psíquicas”. Estes aspectos, junto a outros parâmetros, nomeadamente, a disponibilidade de presa, o habitat seleccionado, vão determinar o chamado “nicho ecológico” (López-Gordo, Lázaro e Fernández-Jorge, 1977).

A avaliação destes parâmetros, fornece dados importantes, principalmente no que diz respeito ao grau de antropofilia dos animais, que podem favorecer a exposição a estes tipos de xenobióticos.

Começando pelo Bufo Real (*Bubo bubo*), observamos que esta espécie é considerada generalista, uma vez que preda uma grande diversidade de animais (Pérez, 1980). Contudo, e após análise de diversos estudos alimentares



Figura 8. Bufo-real (*Bubo bubo*).

(Donázar, 1988; Donázar, 1989; Ortego, 2007; Pérez, 1980) o coelho aparece como presa principal, numa grande variedade de zonas. Contudo, um estudo realizado numa zona da Comunidade de Madrid (Pérez, 1980), observou que os animais presentes alteravam a presa principal para a ratazana. Este facto, explicava-se pelas características antropofílicas do

habitat em questão, aumentando o número de *Rattus norvegicus* (espécie com elevadíssimo grau de antropofilia) (Pérez, 1980). Apesar do habitat típico do Bufo-Real (*Bubo bubo*) ser o descrito na tabela 4, não é estranho encontrarem-se casais reprodutores cerca de zonas urbanizadas (estudo da autora para o

Parque Regional do Rio Guadarrama, Madrid, 2009; dados não publicados) e assim dirigir a caça às presas mais abundantes dentro do espectro disponível.

Continuando no grupo das aves rapinas nocturnas, analisamos as três espécies restantes, Coruja das Torres (*Tyto alba*), Coruja do Mato (*Strix aluco*) e Bufo Pequeno (*Asio otus*). Ao observarmos a Tabela 4, verificamos que existem diferenças importantes relativas ao habitat e dieta destes animais.

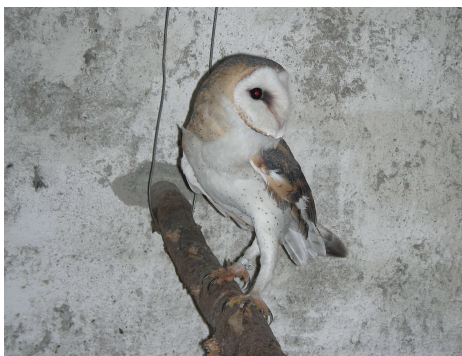


Figura 9. Coruja-das-torres (*Tyto alba*).



Figura 10. Bufo-pequeno (*Asio otus*).

Observamos que a Coruja do Mato (*Strix aluco*) é a espécie mais generalista das três, tendo o grupo das aves e insectos um papel significativo na sua alimentação. Contudo, e dentro da comparação destas espécies, é considerado um caçador de floresta e bosque, sendo um especialista na caça de roedores e mamíferos insectívoros silvestres (López-Gordo *et al*, 1977). Apesar destas espécies de micromamíferos também se moverem em zonas urbanizadas não parece que no caso da Coruja do Mato (*Strix aluco*), sejam

caçados nestas zonas, o que pode ocorrer no caso do Bufo Pequeno (*Asio otus*). A Coruja das Torres (*Tyto alba*), é pelo habitat seleccionado, aquela que possui um maior carácter antropofílico dentro das espécies estudadas, caçando em zonas urbanizadas e suas periferias espécies de micromamíferos que se movimentam nestas áreas (Tabela 4).

As aves de rapina diurnas incluídas neste estudo apresentam uma grande diversidade de aspectos ecológicos (Tabela 4). Relativamente à Águia de Asa Redonda (*Buteo buteo*) é considerada uma espécie generalista e com um carácter oportunista muito marcado, podendo ser encontrado muitas vezes posado nas vedações das estradas (Meunier *et al* 2000). Contudo num estudo realizado em que se compara este tipo de comportamento nesta espécie e no Peneireiro Comum (*Falco tinnunculus*), concluiu-se que os últimos preferem estradas secundárias próximas de campos agrícolas ou quintas, enquanto a Águia de Asa Redonda (*Buteo buteo*) prefere auto-



Figura 11. Casal de Peneireiro comum (*Falco tinnunculus*).

estradas ou vias rápidas mais afastadas de zonas habitadas (Meunier *et al*, 2000). Analisando este último estudo e os dados da tabela 4 conclui-se que o Peneirero Comum (*Falco tinnunculus*) apresenta um grau superior de antropofilia sendo a sua dieta baseada sobretudo em micomamíferos.

Quanto ao Gavião (*Accipiter nisus*) e Azor (*Accipiter gentilis*), observa-se que ambas espécies possuem uma dieta essencialmente ornitófaga, contudo com escolhas de habitat distintos (Tabela 4).

Por último, entramos no grupo de aves necrófagas, representadas neste estudo pelo Grifo (*Gyps fulvus*). Tal como aparece descrito na tabela 4, estes animais alimentam-se de praticamente todo o tipo de animais mortos, constituindo os animais de produção pecuária um papel fundamental. Devido a este facto, compreende-se o porquê de esta espécie animal estar intimamente relacionada com o Homem, podendo deslocar-se a grandes distâncias do seu habitat de colónia (50-70 km) para se alimentar (Tabela 4). As normas sanitárias impostas relativas à recolha de gado morto dos pastos, tem produzido uma clara diminuição do alimento disponível para estes animais (Parra e Tellería, 2004). Assim, a sua alimentação tem sido ampliada a outros animais, representando os lagomorfos (Ordem *Lagomorpha*) uma presa importante (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da ecologia das espécies analisadas.

Espécie	Dieta	Habitat	Observações
Bufo Real (<i>Bufo bufo</i>)	Mamíferos: Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Ratazana (<i>Rattus norvegicus</i>) Murganho (<i>Mus sp</i>) Aves: Perdiz-Comum (<i>Alectoris rufa</i>) Pomba (<i>Columba sp</i>) (Donázar, 1989; Mellado, 1980; Mikola, 1995; Pérez, 1980;)	Zonas de topografia irregular, principalmente com zonas de paredes rochosas (zonas principais de nidificação) junto a zonas arborizadas densas e próximos a cursos de água. Também coberturas de floresta mediterrânea e pastagens. Refere-se a preferência por áreas de pouca utilização humana, contudo não é raro que zonas de bufo real englobem áreas de urbanização moderada. (Donázar, 1988; Mikola, 1995; Ortego, 2007)	O Bufo Real é considerado um predador de topo, com um acusado ecletismo trófico, podendo pregar sobre um grande e distinto grupo de espécies, desde insectos outros predadores como raposas e outras espécies de rapinas tanto nocturnas (Mocho-Galego, Coruja do Mato...) e diurnas (principalmente juvenis) (Mikola, 1995)
Coruja das Torres (<i>Tyto alba</i>)	Mamíferos: Murganho (<i>Mus spp</i>) Rato de campo (<i>Apodemus sylvaticus</i>) Musarango de Dentes Brancos (<i>Crociodura russula</i>) Rato silvestre (<i>Microtus arvalis</i>) Ratazana (<i>Rattus norvegicus</i>) Aves: Passeriformes (Delibes et al. 1984; López-Gordo et al. 1977; Mikola, 1995)	Zonas urbanizadas, nidificando em casas rurais, torres de igrejas, ruínas, etc. Contudo pode englobar nos seus terrenos de caça zonas agrícolas e de bosque (Arriero, 2002; Mikola, 1995)	Espécie com elevado grau de antropofilia (Mikola, 1995)
Gavião (<i>Accipiter nisus</i>)	Aves: Pardal (<i>Passer domesticus</i>) Estorninho (<i>Sturnus spp</i>) Melro (<i>Turdus merula</i>) Cotovia (<i>Galerida theklae</i>) Andorinhão (<i>Apus apus</i>) Columbiformes (<i>Columba spp</i>) Mamíferos: Roedores (<i>Apodemus sylvaticus</i> , <i>Crociodura russula</i> , <i>Microtus spp</i>) (Mañosa e Oro, 1991)	Principalmente bosques, plantações. Nas zonas agrícolas apenas aparece em zonas que possuam mosaicos de bosque. Relativamente a censos realizados dentro da comunidade de Madrid, foram observados em parques urbanos e zonas ajardinadas próximas a urbanizações (Arriero, 2002)	O dimorfismo sexual inverso nesta espécie é muito marcado, sendo a fêmea de uma dimensão muito superior ao macho, pelo que a diferença de presas caçadas é significativo. Assim, o macho caça aves de tamanho pequeno e a fêmea pode atingir presas de tamanho superior como é o caso das pombas. Espécie migratória. (Brown e Amadon, 1968)

Tabela 4. (Continuação)

Penereiro Comum (<i>Falco tinnunculus</i>)	<p>Mamíferos: Rato silvestre (<i>Microtus alvaris</i>) Musaranho de dentes brancos (<i>Crocidura russula</i>)</p> <p>Répteis: Sardão (<i>Lacerta lepi</i>)</p> <p>Aves: Pardal (<i>Passer domesticus</i>) Outros passeriformes (Fargallo et al, 2009)</p>	Preferência por habitats de estrutura aberta, evitando zonas boscosas densas. As maiores densidades populacionais são observados em terrenos de cultivo. Muitas vezes observado em cidades, onde pode nidificar (Arriero, 2002)	No caso específico da Comunidade de Madrid é muito frequente a sua presença em cidades. (Dados da autora, não publicados)
Bufo Pequeno (<i>Asio otus</i>)	<p>Mamíferos: Rato de campo (<i>Apodemus sylvaticus</i>) Rato silvestre (<i>Microtus alvaris</i>) Murganho (<i>Mus spp</i>)</p> <p>Aves: Passeriformes (Delibes et al, 1984; González e Oriti; López-Gordo et al, 1977; Mikola, 1995)</p>	Zonas de bosque pequenos ou mais frondosos. Preferencialmente mosaicos de bosque rodeados por zonas mais abertas onde normalmente possui as suas zonas de caça (Mikola, 1995)	
Grifo (<i>Gyps fulvus</i>)	Ave necrófaga. A sua alimentação baseia-se numa grande variedade de cadáveres de mamíferos, tanto espécies silváticas como o coelho, como espécies domésticas (gado, particularmente, ovelhas, cabras e bovídeos) (Del Hoyo et al. 1994)	Encontra-se em praticamente todas as variedades de terrenos, contudo o seu habitat normal são as zonas montanhosas, nidificando e tendo os seus sítios de descanso em zonas rochosas. (Peterson et al. 1991)	Animal que vive em colónias. O seu nível populacional está directamente relacionado com a actividades pecuária, podendo percorrer distâncias extensas para a alimentar-se (Parra e Tellería, 2004)
Águia de Asa Redonda (<i>Buteo buteo</i>)	<p>Mamíferos: Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Roedores espécies <i>Microtus sp</i> Rato de Campo (<i>Apodemus sylvaticus</i>) Musaranho de dentes brancos (<i>Crocidura russula</i>) Ratazana (<i>Rattus norvegicus</i>)</p> <p>Répteis</p> <p>Aves: Passeriformes (Del Hoyo et al. 1994)</p>	Habitat florestais integrados ou fragmentados por zonas abertas, zonas de cultivo ou pastagens. (Del Hoyo et al. 1994)	Espécie que se adapta a uma diversidade grande de habitats. Predador generalista. (Del Hoyo et al. 1994)
Açor (<i>Accipiter gentilis</i>)	<p>Aves: Columbiformes (<i>Columba sp</i>) Corvídeos (<i>Corvus sp, Pica pica, Garrulus glandarius</i>) Melro (<i>Turdus merula</i>) Perdiz (<i>Alectoris rufa</i>)</p> <p>Mamíferos: Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)</p> <p>Répteis: Sardão (<i>Lacerta lepida</i>) (Padial et al. 1998; Verdejo, 1994)</p>	Zonas de bosque geralmente muito densas. Muitas vezes pode surgir em zonas arborícolas que se encontrem cerca de campo aberto. (Peterson et al, 1991)	Espécie muito similar ao Gavião no aspecto claramente ornitóforo e dimorfismo sexual inverso acentuado que possuem ambas espécies. Contudo, o tamanho de um Açor é substancialmente superior o que faz com que as presas deste sejam maiores, daí a maior presença de columbiformes e outras espécies como corvídeos que não apareciam ou de forma pouco significativa no Gavião. (Del Hoyo et al. 1994)
Coruja do Mato (<i>Strix aluco</i>)	<p>Mamíferos: Rato de campo (<i>Apodemus sylvaticus</i>) Roedores pertencentes a <i>Microtus sp</i> Murganho (<i>Mus sp</i>) Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)</p> <p>Aves: Passeriformes (López-Gordo et al. 1977; Mikola, 1995)</p>	Espécie claramente florestal, contudo pode, esporadicamente, aparecer em parques e jardins extensos. (Arriero, 2002; Mikola, 1995)	Esta espécie de rapina nocturna, quando comparada com a Coruja das Torres e Bufo pequeno é considerada como a mais especializada na captura de roedores silváticos e de aves. Também quando comparada com estas é aquela cujo habitat menos se aproxima do homem. (López-Gordo et al, 1977)

Também qualquer tipo de predadores carnívoros, podem ser fonte de alimentação (Del Hoyo *et al*, 1994)

Não são mencionados os dados de Milhafre Real (*Milvus milvus*), Tartaranhão Caçador (*Circus pygargus*) e Mocho-Galego (*Athene noctua*) uma vez que o número de indivíduos analisados não foi significativo.

Seleccção da Presa pelas Aves de Rapina e seu envolvimento na Exposição aos Rodenticidas

A predação é um processo complexo que relaciona um grande número de factores que caracterizam a relação predador-presa (tamanho do grupo “presa”, sexo e idade da presa, nível de vigilância, tipo de habitat, tácticas do predador, entre outras) (Kenward, 1978).

Uma das variantes nesta interacção é a condição geral em que se encontra a presa. Normalmente existe a tendência para assumir que os predadores seleccionam positivamente indivíduos débeis, com uma condição física fraca, contribuindo assim para a selecção natural (Fernández-LLario e Hidalgo de Trucios, 1995; Moller e Erritzoe, 2000; Murray, 2002). O grau em que um animal é capturado parece estar relacionado com a dificuldade de predação do mesmo. Assim animais que apresentam algum tipo de debilidade serão preferencialmente predados, fazendo com que as taxas de sucesso sejam elevadas com um dispêndio menor de energia por parte do predador (Moller e Erritzoe, 2000; Murray, 2002; Penteriani *et al*, 2008).

Tomando como exemplo o Bufo-Real (*Bubo bubo*), e tal como descrito anteriormente, este animal é considerado um excelente caçador do coelho. Isto explica-se pela extrema facilidade de captura dos mesmos por parte dos indivíduos desta espécie. Devido a este facto, os benefícios de predação de indivíduos com debilidade deveriam ser menores nestes casos, isto porque, os indivíduos ditos normais, são também de fácil captura. Contudo verifica-se uma possível dominância de indivíduos de pior condição física de entre os coelhos que fazem parte da dieta destes animais. Sabe-se também que aumentam o consumo de coelho nas alturas de Verão, o que pode estar relacionado com certos processos infecciosos como é o caso da mixomatose que atinge os seus valores mais elevados nesta altura do ano (Penteriani *et al*, 2008).

Sabe-se também que nos casos de predação de aves, existe uma presença significativa de animais com anomalias ósseas, morfológicas, animais com infecções parasitárias ou simplesmente com condição corporal baixa (Fernández-LLario e Hidalgo de Trucios, 1995).

A captura destes animais pode ser explicada pelo facto do predador não realizar uma selecção activa, caçando animais débeis e normais, contudo a percentagem de sucesso dos ataques é superior nos animais em piores condições. Outra explicação é o facto das diversas condições de debilidade possam ser percebidas e apreendidas pelos predadores como “pistas visuais” e poderem estar relacionadas com a facilidade de captura (Penteriani *et al*, 2008).

No que diz respeito ao caso específico dos rodenticidas, os estudos descritos em capítulo anterior, descrevem as alterações *ante-mortem*, fisiológicas e comportamentais que os roedores apresentam e o grau de vulnerabilidade à sua selecção como presa por parte das aves de rapina, que após esta breve exposição pode ser melhor compreendida.

6. Desenvolvimento experimental

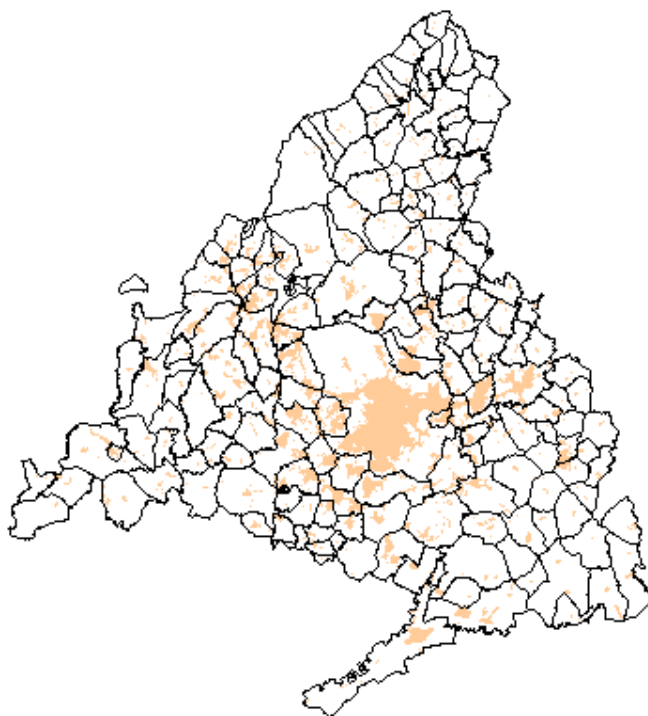
6.1 Objectivos

O objectivo principal deste trabalho, é a análise de ocorrência de Brodifacume e da Bromadiolona, em aves de rapina selvagens, tentando, nos casos de detecção positiva, relacionar este facto com os resultados das necrópsias e com a existência de possíveis efeitos sub-letais que pudessem, indirectamente, conduzir à morte dos animais. Para atingir o objectivo proposto identificaram-se os parâmetros que poderiam ser de maior importância na avaliação destes efeitos. Deste modo foi estudado a relação entre a presença/ausência dos dicumarínicos com a espécie animal, a idade e sexo e também com as informações obtidas nas necrópsias: condição corporal, alterações músculo-esqueléticas, alterações no aparelho cardio-vascular, sistema respiratório, sistema digestivo e glândulas anexas, sistema hematopoiético e sistema nervoso central. Para além destas variáveis estudadas nos animais, foi também efectuada uma análise das causas de ingresso dos mesmos no GREFA, assim como da sua área de proveniência. Este último parâmetro foi avaliado através do mapa de usos do solo da Comunidade de Madrid. Todas estas variáveis foram consideradas importantes para o estudo dos possíveis efeitos sub-letais que estes compostos podem originar nas aves de rapina.

6.2 Material e Métodos

Foi realizada a necrópsia a 53 aves de rapina, provenientes de diversos pontos da Comunidade de Madrid (Fig.12), no hospital de fauna selvagem de GREFA. Foram recolhidas amostras de fígado, rim e coração e mantidas a uma temperatura de -18°C para posterior realização de procedimento analítico com vista à detecção dos compostos Brodifacume e Bromadiolona.

Figura 12. Mapa de municípios da Comunidade de Madrid e respectiva densidade populacional (Zonas urbanas em laranja).(Fonte: “Dirección General de Promoción y Disciplina Ambiental/ Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del territorio- CARTANET).



6.2.1 Necrópsia

Para a realização das necrópsias foram utilizados os seguintes instrumentos: tesoura de ponta fina, tesoura de ponta afilada, pinças dente de rato, pinças sem dente, bisturi, serra eléctrica, calibre e régua, material para recolha de amostras, bata, luvas e máscara.

Técnica de Necrópsia utilizada no GREFA.

- 1- Exploração externa
- 2- Molhar e retirar as penas desde a garganta até à cloaca
- 3- Incisão desde o espaço intermandibular até à cloaca
 - a. Observação da gordura subcutânea do ventre e flancos
 - b. Observação do sistema músculo-esquelético
- 4- Observação e desarticulação coxofemural por corte medial
- 5- Recolha de amostras de pele, músculo e nervo ciático
- 6- Incisão desde a zona caudal da quilha até à cloaca (individualizando-a)

- 7- Incisão desde o borde caudal da quilha a ambos os lados
 - a. Observação das vísceras abdominais (intestino, ventrículo, gordura mesentérica, borde caudal do fígado e sacos aéreos)
 - b. Cortar as serosas o mais próximo possível do osso
- 8- Desarticulação dos úmeros
- 9- Separação da pele até se observarem as escápulas
 - a. Cortar as costelas de ambos os lados pela união costochondral finalizando na articulação da cintura escapular
 - b. Expôr a cavidade torácica mantendo intacto o esqueleto
 - c. Observação das vísceras torácicas (coração, pulmões, sacos aéreos, baço e timo nos animais jovens)
 - d. Recolha de amostras
- 10- Exame de diferentes estruturas:
 - a. Timo
 - b. Tiróides
 - c. Paratiróides
 - d. Coração
 - Exame do saco pericárdico
 - Corte da união dos grandes vasos
 - Corte da aurícula direita, seguido do ventrículo direito e artéria pulmonar
 - Corte da aurícula esquerda, ventrículo esquerdo e aorta
 - Visualização das válvulas aurículo-ventriculares
- 11- Aparelho digestivo:
 - a. Extração da língua
 - b. Tracção da traqueia e esófago em sentido caudal e separação dos mesmos
 - c. Passagem do esófago pela bifurcação traqueal
 - d. Remoção do aparelho digestivo através do corte do mesentério
- 12- Tracto respiratório
 - a. Abertura da traqueia longitudinalmente
 - b. Exame dos pulmões e realização de várias incisões para avaliar o interior do mesmo
- 13- Tracto genital
 - a. Visualização de testículos ou ovários
- 14- Glândulas adrenais
- 15- Tracto urinário
 - a. Visualização dos rins e ureteres

- 16- Exploração do tracto digestivo
- 17- Visualização da coluna
- 18- Abertura do crâneo e visualização do cérebro

6.2.2 Análise Química

As amostras foram analisadas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa utilizando a metodologia de Cromatografia Líquida de Camada Fina (CCF), seguindo o procedimento descrito por Carrapiço *et al*, (2006).

Para a realização do processo analítico foi utilizado o seguinte material geral de laboratório: pinças, tabuleiro, balança, copos de 50ml, varetas, decantadores de 250ml, balões de 50ml, evaporador rotativo HEIDOLPH vv-2000, tubos capilares, placa CCF Silica Gel 60 F₂₅₄ (10x10cm) – Merck, ref^a 1.05554, tinas de cromatografia, câmara de visualização UV (254/356 nm) ref. CAMAG UV – CABINET II, estufa.

Para extracção foi utilizado sulfato de sódio e as soluções de acetona (Carlo Erba Reagents, ref^a 400974), clorofórmio (Carlo Erba Reagents, ref^a 438603 e Panreac Chemistry, ref^a 131252 e água destilada (preparada por um sistema Mili-Q da Milipore).

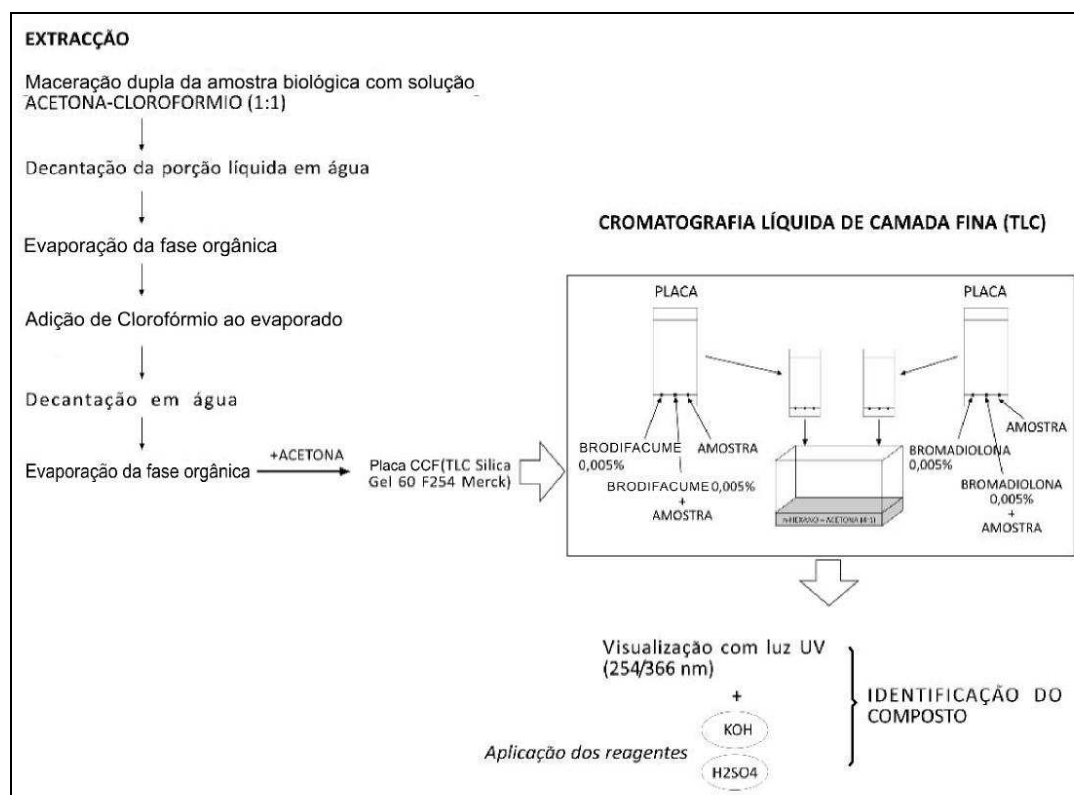
Os solventes utilizados para a eluição das placas de CCF foram a acetona (Carlo Erba Reagents, ref^a 400974) e n-hexano (Carlo Erba Reagents, ref^a 446903).

Como reagentes de visualização foram utilizados o ácido sulfúrico a 96% (Panreac Chemistry) e hidróxido de potássio (Merck, ref^a 6498).

As soluções padrão utilizadas foram o brodifacume (Fluka, ref^a 46036) e bromadiolona (Fluka, ref^a 46035), dissolvidos em acetona a uma concentração de 1 mg/ml.

Os passos da análise química dos compostos são descritos na figura 13.

Figura 13. Fluxograma de análise realizado para detecção e identificação de Brodifacume e Bromadiolona



A identificação do composto foi efectuada através da comparação do factor de retenção (R_f) da solução padrão (Brodifacume e Bromadiolona) com o R_f dos compostos presentes na amostra. Também se utilizaram reagentes de visualização, KOH e H₂SO₄, que após aplicação dos mesmos se avaliou a transformação de cor dos compostos: após aplicação do KOH apresentava uma cor violeta enquanto que após a aplicação de H₂SO₄ a Bromadiolona assumia uma cor rosa.

Nos casos em que os resultados não foram conclusivos, foi utilizado a técnica de Cromatografia Gasosa. Para tal foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent 6890 com coluna capilar (HP-5, 5% Fenil Metil Siloxano, 30m, diâmetro de 320 μ m, com um fluxo de 1.5 ml/min) e detector de ionização de chama pelo método de adições e perfis cromatográficos.

6.2.3 Análise Estatística

Para a análise dos resultados qualitativos obtidos neste estudo realizaram-se tabelas de contingência e a prova de qui-quadrado entre as diferentes variáveis, considerando-os como dados categóricos. O programa estatístico utilizado foi o SPSS, versão 15.0.1. Foram analisados com estes métodos estatísticos as variáveis relativas às alterações encontradas nas necrópsias: Presença de fracturas antigas, alterações musculares, alterações do sistema respiratório, aparelho cardio-vascular, alterações hepáticas, alterações do tracto digestivo, baço, rins e sistema nervoso, assim como a presença de hemorragias celômicas e das cavidades orais e nasais. Cada uma destas alterações foi analisada frente ao resultado de presença e ausência de rodenticida de forma a verificar a existência de uma relação significativa entre eles, isto é, se a presença da alteração orgânica estaria relacionada com a presença de rodenticida, de um modo estatisticamente significativo. Para esta análise considerámos um intervalo de confiança de 95%.

Também foram utilizadas tabelas de contingência e a prova de qui-quadrado para as variáveis condição corporal, causa de ingresso e sexo/idade. No caso da condição corporal, e tal como será explicado posteriormente, os animais foram classificados segundo uma escala de 0 a 5. Para a sua análise estatística os animais foram categorizados em dois grupos: menor ou igual a 3 e maior que 3, subdividindo-os em animais de condição corporal baixa/normal (grupo de 0 a 3) e alta (grupo de 4 e 5).

Relativamente à causa de ingresso, apesar de existirem outras causas de ingresso apresentados na Figura 17, os animais foram categorizados em 4 grupos: trauma contra estrutura, trauma desconhecido, doença e outros de forma a conseguir uma maior potência estatística.

Por último, na variável sexo e idade os animais foram agrupados em 4 categorias: fêmea adulta, macho adulto, fêmea jovem, macho jovem, uma vez que agrupados desta forma nos poderiam fornecer maior informação.

No caso destas variáveis foi também considerado um intervalo de confiança de 95%.

6.3 Resultados

Dos 53 animais analisados, 20 foram positivos a bromadiolona ou brodifacume. A Bromadiolona foi detectada na maioria dos casos (80%).

Para a análise destes resultados, não foi realizada uma separação entre animais Brodifacume e Bromadiolona positivos, devido à semelhança da toxicocinética e toxicodinâmica destes compostos. Através dos resultados analíticos e dos dados obtidos a partir das necrópsias foi realizada uma avaliação tendo em conta as seguintes variáveis: espécie, causa de ingresso, sexo, idade e condição corporal, com o objectivo de relacionar estes parâmetros com a presença de xenobióticos.

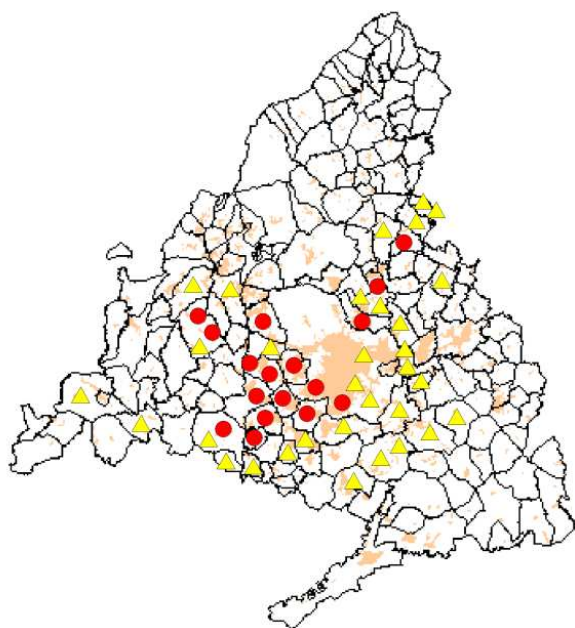
Na figura 14 são apresentadas as distribuições, dentro da Comunidade de Madrid, dos animais analisados relativamente à zona de origem, espécie animal e resultado da análise. Neste mapa não foram colocadas as localizações relativas aos Grifos (*Gyps fulvus*) analisados, uma vez que estes animais se encontravam na altura da morte em instalações de reabilitação do GREFA, por um período bastante alargado (pelo menos 6 meses), e como tal a sua posição no mapa não era significativa. Mais tarde serão referidas as possíveis vias de intoxicação destes animais.

Na figura 15 são apresentadas, para melhor visualização, os indivíduos de duas das espécies mais representativas, Bufo-Real (*Bubo bubo*) e Coruja-das-Torres (*Tyto alba*).

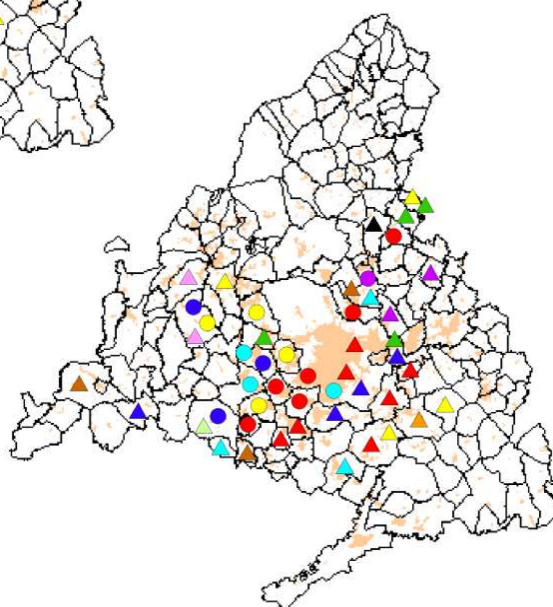
Dentro das espécies analisadas, aquelas que aparecem mais afectadas são: Bufo Real (*Bubo bubo*), Grifo (*Gyps fulvus*), Coruja das Torres (*Tyto alba*), Gavião (*Accipiter nisus*) e Peneireiro Comum (*Falco tinnunculus*) (Figura 16).

A causa de ingresso mais comum em animais positivos a rodenticidas foi trauma desconhecido (6 animais), ou seja, os animais à exploração apresentavam evidências de trauma (hematomas, fracturas, entre outras), contudo pela história apresentada a causa do trauma não foi conclusiva. O número de animais que apresentaram este tipo de causa de ingresso é similar para animais positivos e negativos. Contudo, pode observar-se que o trauma contra estrutura foi predominante em animais positivos (Figura 17; Anexo A2, tabela k), existindo uma relação significativa entre esta causa de ingresso e a positividade a estes compostos ($p = 0.031$). Já os animais electrocutados, submetidos a disparo e atropelados são na sua grande maioria negativos (Anexo A2, tabela k).

Figura 14. Mapa de distribuição dos animais analisados.(Fonte do Mapa Base: “Dirección General de Promoción y Disciplina Ambiental/ Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del territorio- CARTANET).



A- População Total



B- Distribuição por espécie

Legenda.

8-A: ● Animais positivos a rodenticidas
▲ Animais negativos a rodenticida

8-B: ○ Animais positivos a rodenticidas
△ Animais negativos a rodenticidas

Vermelho: Peneireiro-Comum (*Falco tinnunculus*)
Azul: Gavião (*Accipiter nisus*)
Amarelo: Bufo Real (*Bubo bubo*)
Azul-Claro: Coruja-das-Torres (*Tyto alba*)
Rosa: Coruja-do-Mato (*Strix aluco*)
Verde: Águia-de-Asa-Redonda (*Buteo buteo*)
Violeta: Bufo-Pequeno (*Asio otus*)
Castanho: Açor (*Accipiter gentilis*)
Laranja: Mocho-Galego (*Athene noctua*)
Verde claro: Tartarnhão-Caçador (*Circus pygargus*)
Preto: Milhafre Real (*Milvus milvus*)

Figura 15. Mapas de distribución do Bufo-Real (*Bubo bubo*) (A) e da Coruja das Torres (*Tyto alba*) (B) analisados (Fonte do mapa base: Fonte do Mapa Base: “Dirección General de Promoción y Disciplina Ambiental/ Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del territorio- CARTANET).

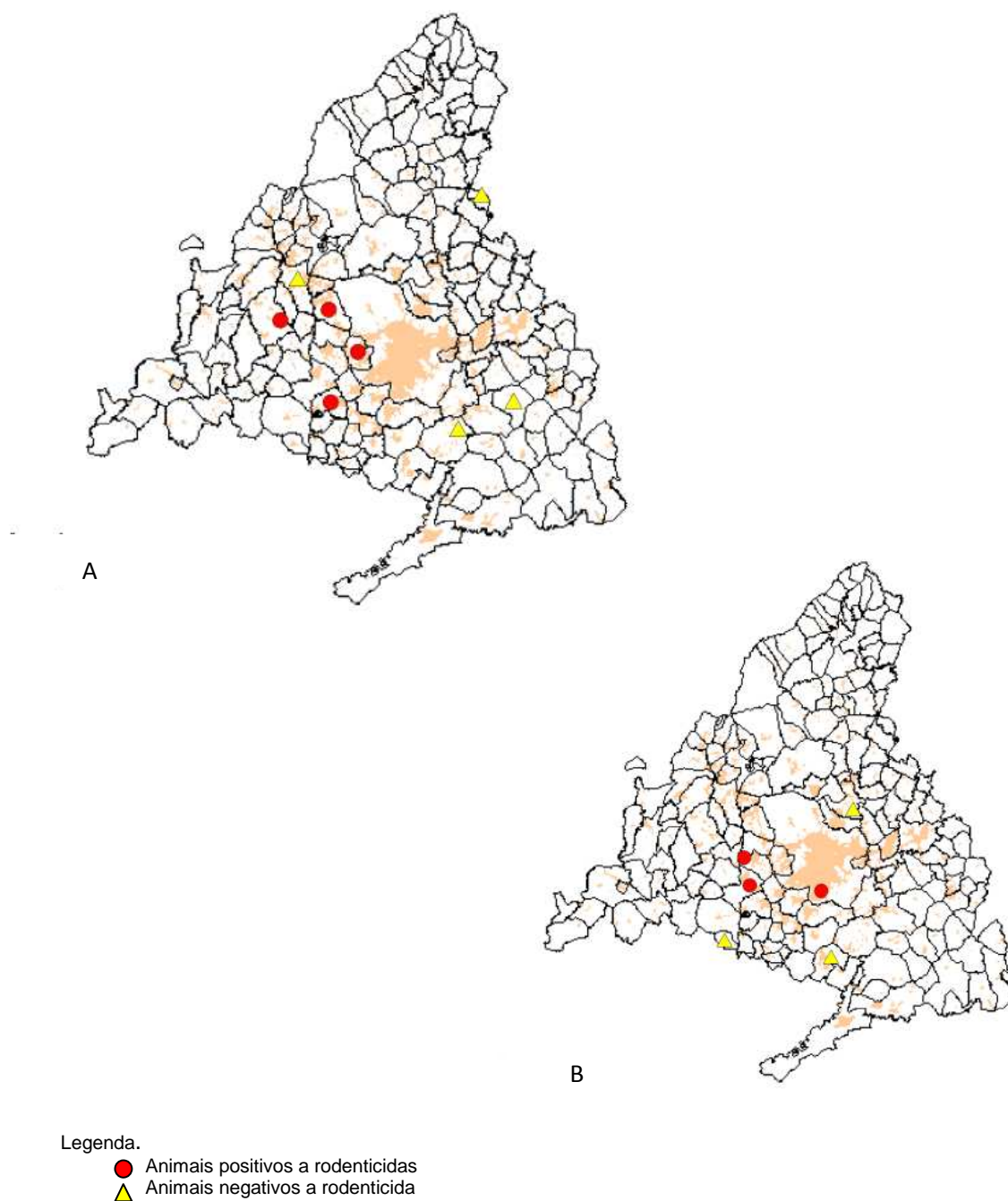


Figura 16. Gráfico de distribuição dos animais positivos/não detectado e respectiva espécie.

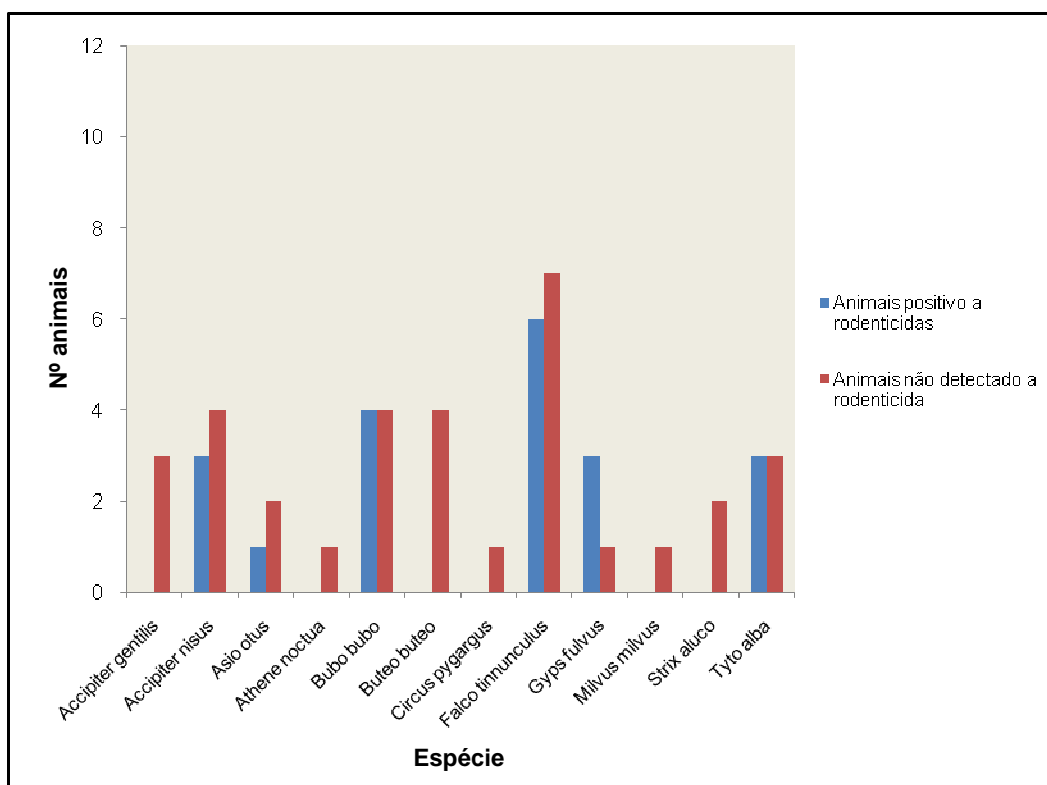
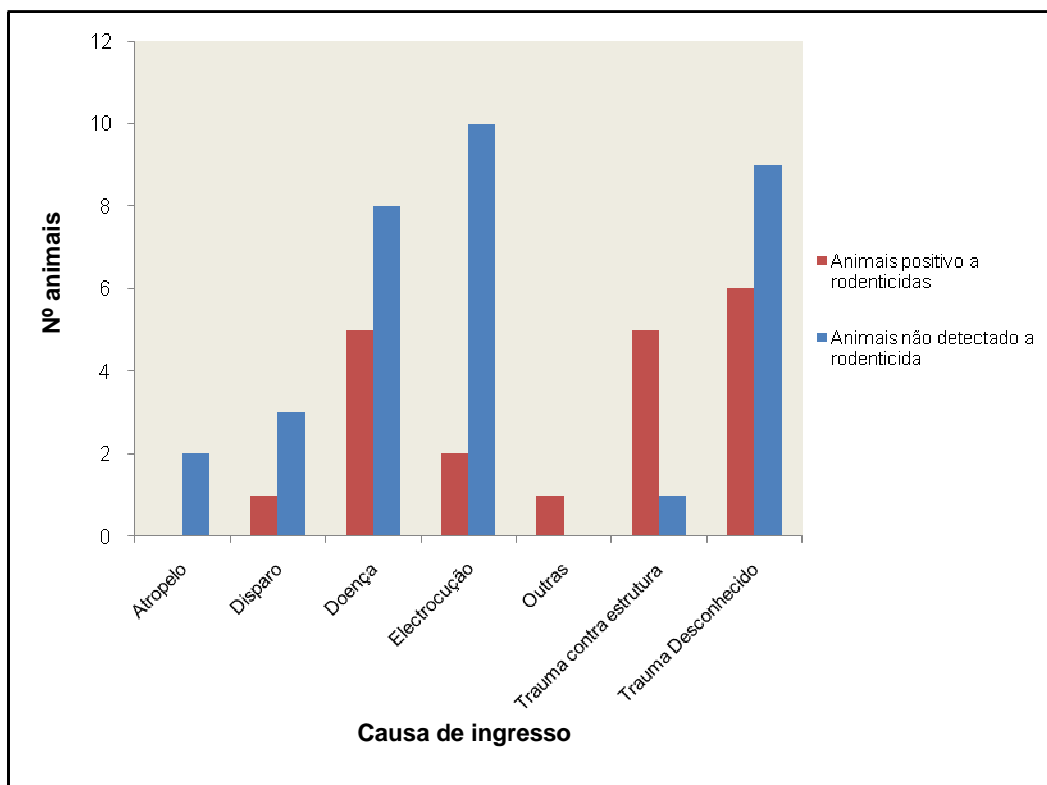


Figura 17. Gráfico de distribuição animais positivos/não detectado e causa de ingresso



Após análise dos dados provenientes das necrópsias efectuadas, foram observadas diferenças importantes (Tabela 5). Todos os parâmetros analisados apresentaram uma maior incidência nos animais positivos, e algum deles, como alterações no sistema cardiovascular, no fígado, no baço e hemorragia intracelómica, apenas surgem nestes animais. Comparando todas as alterações dos sistemas e órgãos, encontradas à necrópsia em relação com o resultado da análise toxicológico (ver anexo A1, tabelas de contingência e provas Chi-quadrado) foram encontradas relações significativas, para um intervalo de confiança de 95% (p -valor < 0.05), para as alterações encontradas no sistema muscular ($p = 0.002$), cardiovascular ($p = 0.000$), respiratório ($p = 0.006$), alterações do fígado ($p = 0.000$), tracto digestivo ($p = 0.049$), baço ($p = 0.022$) e sistema nervoso ($p = 0.004$), para além da presença de outras hemorragias ($p = 0.048$), nomeadamente as intracelómicas.

Tabela 5. Distribuição das lesões encontradas à necrópsia nos animais positivos e negativos a rodenticidas.

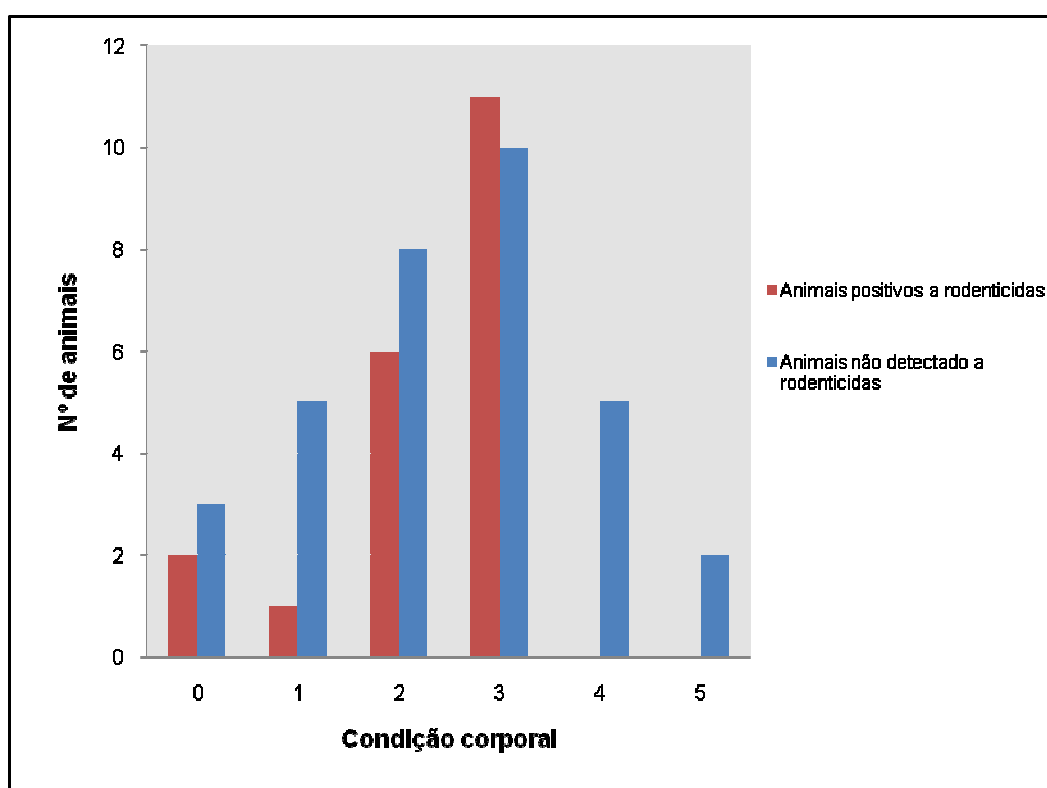
		Resultado	
		ND	positivo
Fracturas antigas	0	32	17
	1	1	3
Hematomas	0	31	15
	1	2	5
Alteração peitorais	0	33	17
	1	0	3
Hemorragia tracto respiratório	0	21	5
	1	12	15
Hemopericárdio	0	31	16
	1	2	4
Outras Cardiovascular	0	33	17
	1	0	3
Alterações miocárdio	0	33	15
	1	0	5
Fígado congestivo	0	33	17
	1	0	3
Alteração do aspecto fígado	0	33	12
	1	0	8
Enterite serohemorrágica	0	30	14
	1	3	6
Baço congestivo	0	33	17
	1	0	3
Rins congestivos	0	31	16
	1	2	4
Hemorragia cerebral	0	32	17
	1	1	3
Vasos cerebrais congestivo	0	27	11
	1	6	9
Hemorragia intracelómica	0	33	17
	1	0	3
Outras hemorragias	0	31	18
	1	2	2

Legenda

0: Ausência de alterações
1: Presença de alterações

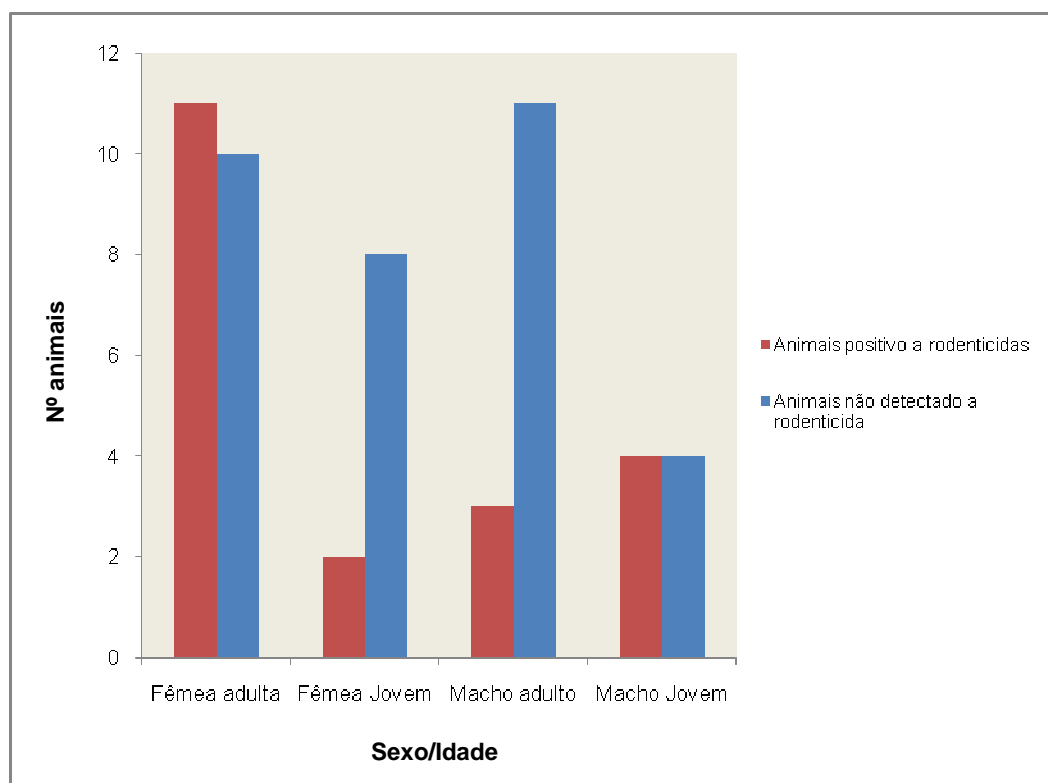
O primeiro parâmetro a ser observado aquando da exploração de uma ave de rapina é a sua condição corporal, avaliando a relação quilha/músculos peitorais. Assim, atribui-se um valor de 0 a 5, representando o 0 caquécia e 5 obesidade. No caso concreto deste estudo foi observado (Figura 18) que apesar da distribuição da condição corporal ser similar nos animais positivos e negativos até à categoria 3, nenhum animal positivo ingressou com uma condição corporal superior a esta (considerado no Hospital da GREFA como valor de condição corporal normal). Já em relação aos animais negativos aparecem 4 e 5. Assim foi encontrada uma relação entre uma condição igual ou menor que 3 e os animais positivos ($p = 0.027$) (Anexo A3, tabela I).

Figura 18. Distribuição positivo/não detectado vs condição corporal.



Por último e relativamente ao sexo e idade dos animais analisados, não foi encontrada uma relação positiva entre estes parâmetros e o resultado da análise das substâncias ($p= 0.148$), apesar da percentagem de fêmeas adultas ser superior nos animais positivos (Anexo A4, tabela m).

Figura 19. Gráfico de distribuição dos indivíduos positivos/não detectados entre as diferentes classes de idade e sexo.



6.4 Discussão

No que diz respeito às espécies animais, analisadas neste estudo, que mais significativamente foram afectadas por estes compostos, certos aspectos da sua ecologia podem ter sido de extrema importância nos resultados.

Dentro das espécies de aves de rapina nocturnas, convém recordar, que a Coruja das Torres (*Tyto alba*) foi uma das espécies mais afectadas neste estudo (3/6), já no caso do Bufo Pequeno (*Asio otus*) apenas um indivíduo surge como positivo e não foram detectados resíduos no caso das duas Corujas das Torres (*Strix aluco*) analisadas (Figura 16). Ao observarmos a tabela 4 verificamos que a antropofilia relativa ao habitat destas três espécies vai diminuindo na mesma ordem, ou seja; Coruja das Torres (*Tyto alba*), seguido do Bufo Pequeno (*Asio otus*) e por último a Coruja do Mato (*Strix aluco*). Também se observam diferenças importantes no que diz respeito às espécies predadas por estes animais (Tabela 4). O elevado grau de antropofilia na escolha do habitat da Coruja das Torres (*Tyto alba*), conjuntamente com as espécies de roedores caçadas podem explicar o maior número de animais positivos quando comparados com as outras duas espécies.

Também o Bufo-Real (*Bubo bubo*), aparece de forma significativa no grupo dos animais positivos. Tal como referido no capítulo 5 deste trabalho, estes animais, e especificamente no que se refere à comunidade de Madrid, podem seleccionar como habitat zonas que se encontrem próximas a núcleos urbanos, podendo alimentar-se de espécies de roedores intimamente relacionados com este meio. Tal facto pode explicar a positividade nesta espécie animal. Apesar destes dados, a via de exposição aos rodenticidas por parte destes animais pode não estar apenas restringida a este tipo de roedores, uma vez que noutras espécies que entram no espectro alimentício do Bufo real, como é o caso da Lebre (*Lepus europaeus*), Pombo (Gén. Columbidae) e outros predadores carnívoros, foram detectados níveis de rodenticidas anticoagulantes importantes (Olea et al, 2009).

A análise das aves rapinas diurnas, os resultados obtidos relativamente às espécies ornitófas, como é o caso do Gavião (*Accipiter nisus*) e do Açor (*Accipiter gentilis*) (Figura 16), foram inesperados.

Em primeiro lugar pelo facto de o Gavião (*Accipiter nisus*) se alimentar de forma quase exclusiva de aves, sendo os micromamíferos quase insignificantes na sua dieta (Tabela 4); em segundo lugar devido ao facto de que em duas espécies cuja base alimentar é similar, uma apresenta indivíduos positivos e a outra não. Uma das explicações possíveis pode ser a escolha das zonas de caça

destes animais (Tabela 4). O Gavião (*Accipiter nisus*) tem uma dimensão bastante inferior ao Açor (*Accipiter gentilis*), alimentando-se de pequenos pássaros, sendo talvez a presa de maior dimensão o Pombo (Gén. Columbidae), caçado quase exclusivamente pelas fêmeas, devido ao elevado dimorfismo sexual inverso presente nesta espécie (Tabela 4). Esta espécie pode responder positivamente a ambientes urbanos, uma vez que nestas zonas existe uma grande densidade de pequenos passeriformes, que constituem a base da sua dieta (Chace e Walsh, 2006; Mañosa e Oro, 1991; Palomino e Carrascal, 2006).

Exactamente o contrário passa no caso do Açor (*Accipiter gentilis*), que se alimenta de aves maiores normalmente silvestres e também de coelho. Outra questão que se coloca é qual a via de exposição aos rodenticidas que sofre o gavião; Apesar de micromamíferos poderem estar presentes na sua dieta, não representam uma parte significativa da mesma. Assim, será de especular que a via mais provável foram as pequenas aves, que como referido anteriormente (Eason e Spurr, 1995a; Eason e Spurr, 1995b; Eason *et al*, 1999; Eason *et al*, 2002; Eason *et al*, 2001) podem ingerir os xenobióticos em causa neste estudo, na sua forma granulada.

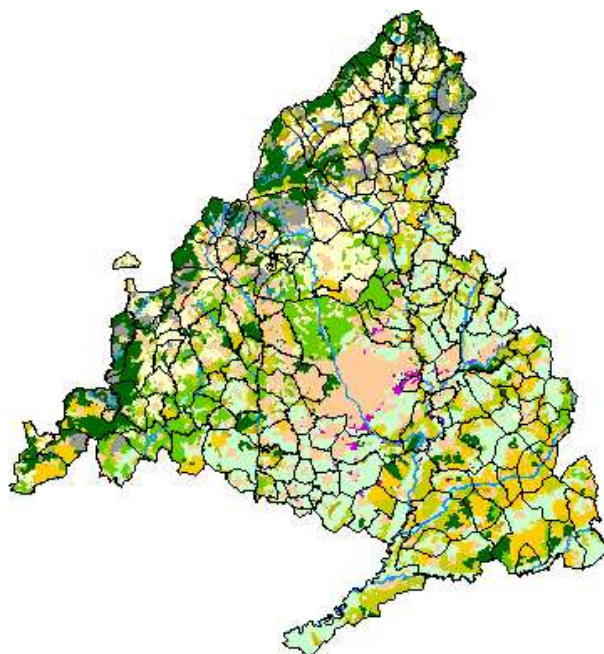
No caso dos Peneireiros-Comum (*Falco tinnunculus*) positivos neste estudo, a via de exposição foi, de forma quase segura, os micromamíferos. Neste caso, a exposição a rodenticidas pode ser explicada pela preferência destes animais por zonas abertas de cultivo, zonas de cereal e também por zonas densamente urbanizadas (Tabela 4).

Relativamente à Águia de Asa Redonda (*Buteo buteo*), apesar da importância de diferentes espécies de roedores na sua dieta, a ausência de animais positivos, pode estar relacionada com a preferência destes animais por zonas não urbanizadas (Zuberogoitia *et al*, 2006).

Por último, no caso dos Grifos (*Gyps fulvus*), não parece provável que a exposição aos compostos analisados seja produzida a partir das espécies pecuárias incluídas no seu espectro alimentício. Por lógica, serão os animais silvestres a razão para o aparecimento de Grifos (*Gyps fulvus*) positivos neste estudo, serão, no entanto, mencionadas adiante as condições especiais que os indivíduos analisados apresentavam.

Depois desta análise, verificamos que a maioria das intoxicações nestes animais serão secundárias, podendo ocorrer casos de envenenamento terciário no caso do *Bubo bubo*, uma vez que é o único predador de topo presente neste estudo, e o *Gyps fulvus*, devido ao seu carácter necrófago.

Figura 20. Mapa de tipos de usos de solo na Comunidade de Madrid
(Fonte do Mapa Base: "Dirección General de Promoción y Disciplina Ambiental/
Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del territorio- CARTANET).



Legenda:

- Actividades industriais e lixeiras
- Áreas de extracção mineira
- Areas incendiadas
- Cultivos
- Barragem
- Mato de Zimbro e Junipera
- Frondosas caducifolias e marcescentes
- Mato baixo
- Mosaicos de cultivo/pasto/zonas arborizadas (<75%)
- Pastos
- Pinhais
- Zonas rochosas
- Zonas urbanizadas
- Núcleos de povoação

Após visualização das figuras 20 e 14 (Mapa de distribuição dos animais analisados), podemos verificar que existe uma similitude entre os dados de habitat anteriormente referidos e as zonas de onde provêm os animais positivos. Estes animais encontravam-se, na sua grande maioria, em zonas mistas, isto é, zonas urbanizadas, rodeados por zonas arbóreas e com pequenas zonas de cultivo. As zonas agrícolas e campos de cereal quando se encontram isoladas não parecem representar um foco de problema, no caso dos animais analisados neste estudo.

Outro facto importante reside no grande núcleo de animais positivos estar praticamente circunscrito a uma mesma zona. Tal como se observa no mapa (Figura 14), esta área corresponde à zona Oeste da Comunidade de Madrid, a mais urbanizada de toda a comunidade. Também corresponde aos limites do Parque Regional do Rio Guadarrama.

Relativamente aos animais positivos encontrados fora da zona antes referida, sabe-se, através de informação recolhida na altura de captura dos animais, que se encontravam em zonas arbóreas pertencentes a centros empresarias. Estas áreas podem, por lógica, sofrer controlos com rodenticidas.

O caso específico dos Abutres incluídos neste estudo

Esta espécie animal merece uma consideração especial devido a condições específicas que dificultam a interpretação dos resultados obtidos.

Com excepção de um animal, todos os outros se encontravam, na altura da sua morte, em instalações de reabilitação do centro GREFA, à espera da sua libertação. Estes últimos também eram originários de outras zonas de Espanha que não a Comunidade de Madrid.

O facto de esta espécie animal aparecer de forma significativa no grupo dos animais positivos, levanta algumas questões. Em alguns casos estes animais encontravam-se nestas instalações desde a metade final do ano 2007. Tal como referido anteriormente estão descritos casos de detecção de compostos anticoagulantes após períodos de tempo bastante prolongados, o que poderia haver ocorrido nestes casos. Isto é, que a contaminação pudesse ter ocorrido antes do seu ingresso no primeiro centro de recuperação de origem. Contudo, esta situação não pode ser assegurada. Tal acontece porque o centro GREFA não pode garantir que estes animais não tenham estado em contacto com rodenticidas nas suas instalações, através da sua alimentação. Esta é maioritariamente constituída por animais de produção, essencialmente ovelhas, cedidas por pastores ao centro. Apesar de isso no caso de animais silvestres, especificamente javalis e corços, que ingressam mortos, sem causa aparente de doença, estes entram também na sua alimentação. No caso destes animais, não podemos garantir que no período *ante-mortem* pudessem ter estado em contacto com estes xenobióticos. Como tal não se pode assegurar que a persistência elevada dos compostos no organismo destes animais seja devida a tempos de semi-vida bastante prolongados.

Alterações apresentadas à Necrópsia e possíveis efeitos sub-letais

Após revisão bibliográfica, conclui-se que apesar de ser consensual que a presença de hemorragias, quer externas quer internas, são características deste tipo de intoxicações, os resultados obtidos pelos diversos autores analisados sempre variam. O mesmo acontece neste estudo.

Seguidamente serão analisados diversos sistemas de forma isolada para melhor compreensão da possível relação do Brodifacume e Bromadiolona no aparecimento das alterações nos mesmos.

Aparelho músculo – esquelético

Neste estudo, o envolvimento da vitamina k no metabolismo ósseo, referida anteriormente, é importante, não só pelo facto da maioria dos animais incluídos apresentar fracturas recentes mas também pela presença de fracturas antigas: 3 em animais positivos e apenas 1 em animais negativos. Contudo não foi encontrada uma relação significativa entre estes entre a presença de fracturas, quer recentes como antigas, e a positividade aos compostos analisados ($p > 0.005$). Apesar de isso seria importante a realização de novos estudos que pudessem aprofundar esta temática.

Dentro das alterações musculares visualizadas, os hematomas foram encontrados em maior número nos animais positivos, contudo a diferença relativamente aos negativos não é significativa. A presença de hematomas é uma das alterações mais vezes descritas nos casos de intoxicação por rodenticidas (Gupta, 2007; Murray e Tseng, 2008). Tal facto é compreensível pelo modo de acção dos compostos em causa. Os hematomas são lesões relativamente benignas, sendo escassas as citações a complicações dos mesmos. Uma das consequências associadas ao tratamento com warfarina consiste na neuropatia femural, devido a hematoma ou hemorragia intramuscular ilíaca, em humanos (Uncini *et al.* 1981, Ong, 2007). Outras hemorragias intramusculares relacionadas com o tratamento com o mesmo composto podem conduzir a choque. Estas complicações, contudo não parecem estar presentes nos animais analisados, uma vez que os hematomas observados pareciam contribuir, em conjunto com outros condicionantes, para um mau estado físico geral, e não de forma isolada.

Para além dos hematomas, foram também observados, e neste caso de forma exclusiva em animais positivos (3 indivíduos), alterações ao nível dos músculos peitorais. Estas alterações consistiam numa coloração esbranquiçada,

não uniforme, dos músculos peitorais. Este tipo de alteração aparece na bibliografia como característica de carências em Vitamina E e selénio (Harrison e Lightfoot, 2006). Contudo estas características aparecem descritas em aves de companhia e aves que estão mantidas em cativeiro, o que não é o caso dos indivíduos presentes neste estudo, e como tal a carências vitamínicas em animais selvagens são extremamente raras. Assim, não será provável seja esta a causa neste caso específico. Uma outra explicação pode estar relacionada com o catabolismo proteico (Lindström *et al.* 2000), uma vez que estes animais apresentavam uma condição corporal baixa (igual ou inferior a 2), acompanhada de uma atrofia destes músculos. Assim, e apesar destas alterações apenas aparecerem em animais positivos, não se encontra uma correlação directa (podendo ser indirecta, por via da inanição) entre estas e a intoxicação por anticoagulantes.

Sistema Respiratório

O sistema respiratório das aves possui diferenças importantes relativamente aos mamíferos. Contrariamente a estes últimos os pulmões são pequenos e não variam o seu volume durante a respiração. Também nas aves existe uma separação entre a ventilação e o local onde se processam as trocas gasosas. Assim, a ventilação é mantida pelos sacos aéreos enquanto que as trocas gasosas são efectuadas nos parabrônquios constituintes dos pulmões. Os sacos aéreos permitem, contrariamente ao que ocorre nos mamíferos, uma manutenção contínua do fluxo aéreo nos pulmões, o que permite uma absorção significativamente maior de oxigénio (até 10 vezes mais). Apesar da eficiência respiratória ser maior, a grande quantidade de superfície de trocas gasosas torna estes animais susceptíveis a agentes patogénicos e substâncias tóxicas (O'Malley, 2005; Wittow, 2000). Apesar de isso, as alterações analisadas não parecem estar relacionadas com esta susceptibilidade, mas sim pela acção directa da bromadiolona e brodifacume no sistema de coagulação.

Na tabela 5 a divisão correspondente à hemorragia do tracto respiratório, corresponde exactamente às hemorragias presentes nos pulmões e nos sacos aéreos. Foram encontradas hemorragias pulmonares numa percentagem significativa de animais positivos. Apenas foi visualizado numa *Tyto alba* hemorragia dos sacos aéreos (único animal que apresentava hemorragias generalizadas por todo o organismo). Uma das explicações possíveis para este acontecimento pode ser o facto de estas estruturas possuírem uma fraca irrigação sanguínea (Wittow, 2000).

As complicações respiratórias como resultado de terapia anticoagulante prolongada são consideradas pouco comuns. Este facto pode estar relacionado com o elevado fluxo e baixa pressão sanguínea nos capilares pulmonares. Devido às baixas pressões à perfusão, os defeitos vasculares podem ser mais facilmente corrigidos pela agregação de plaquetas, mesmo nos casos de coagulação deficiente. Apesar dos fenómenos de agregação serem menores no caso dos heterófilos das aves, o mesmo poderia ocorrer.

Apesar disso, estão descritos casos de complicações pulmonares no caso de humanos sujeitos a tratamentos com este tipo de compostos, essencialmente hemorragia e hematoma pulmonares (Papagianus *et al*, 1995; Kaira *et al*, 2003). Já Stone *et al* (1999) mencionou que as hemorragias pulmonares são uma alteração visualizada mais frequentemente em mamíferos que em aves. Contudo, o mesmo não se conclui deste estudo, uma vez que uma percentagem significativa de animais positivos apresentava congestão/hemorragia pulmonar.

Sistema Digestivo e Glândulas Anexas

Dentro do sistema digestivo, a alteração mais significativa encontrada nos animais positivos foi a enterite hemorrágica. Estes animais apresentavam uma congestão intestinal, acompanhada de presença de conteúdo sanguinolento não coagulado no lúmen intestinal.

O aparecimento desta alteração foi já descrito por alguns autores como consequência da exposição de aves a rodenticidas (Coles, 2007; Stone, 1999)

Outra alteração que aparece descrita, neste caso em humanos após terapia anticoagulante, consiste na formação de hematomas intramurais no intestino que, em alguns casos pode conduzir a hemorragia e obstrução intestinal (Maimon *et al*, 2006; Polat *et al*, 2003). Esta patologia não foi contudo observada em nenhum dos animais analisados.

Passando à análise do fígado, as alterações encontradas neste órgão consistiram em alterações congestivas, morfológicas e de consistência do mesmo. Neste último parâmetro foi observada uma diminuição da consistência e/ou um arredondamento dos bordos, alteração correspondente a hepatomegália.

É de referir que não foram incluídas nestas alterações, roturas do órgão por traumas perfurantes (ex: disparos), assim como alterações focais, granulomatosas, apenas visualizadas em animais negativos, uma vez que foi

considerado que seriam devidas a causas bacterianas ou víricas e como tal não relacionadas com as possíveis alterações provocadas pelos xenobióticos.

Também importante é o facto de que em outros estudos com os mesmos compostos, não foram visualizados quaisquer alterações no fígado de animais intoxicados por rodenticidas, contrariamente ao que ocorre neste caso que existe uma relação positiva entre ambos. Apenas Stone *et al.* (2003), no seu último estudo, mencionaram a ocorrência de uma alteração da ultraestrutural do fígado provocada por estes compostos, tal como é referido anteriormente. Também Amitrano *et al.*, (2003) descreveu um episódio de hepatotoxicidade numa mulher após terapêutica com varfarina. Neste caso específico foi detectado uma hepatomegália e após análise histopatológica foi observada uma pequena inflamação nos espaços porta com ausência de inflamação lobular ou lesão celular. Contudo foram encontrados no interior dos hepatócitos vacúolos fracamente eosinofílicos e positivos à coloração ácido periódico-Schiff (PAS), cujo significado não foi clarificado. No caso dos fígados analisados, estas alterações poderiam explicar as alterações morfológicas apresentadas, contudo não foram realizadas análises histopatológicas que possam confirmá-lo.

Apesar de não observadas, as roturas espontâneas do fígado estão descritas na ausência de um trauma significativo, no caso em que o órgão possua uma consistência friável (Davies, 2000), consistência predominante do fígado dos animais positivos.

Aparelho Cardio-Vascular

As alterações com uma frequência significativa presentes nos animais positivos correspondem a hemopericárdio e alterações do aspecto do miocárdio (presença de descolorações ou de zonas mais escuras que poderiam corresponder a zonas de hematoma) e em três animais foi observado congestão das veias coronárias.

O hemopericárdio encontra-se descrito em vários casos de animais envenenados por rodenticidas anticoagulantes e é explicado pelos efeitos destes compostos no sistema de coagulação. Quanto às alterações descritas no miocárdio, foi detectado por Allen *et al.*, (1991) em ratos, uma cardiomiopatia hemorrágica em animais com insuficiência em vitamina k. Esta cardiomiopatia caracteriza-se histologicamente por uma degenerescência miofibrilar, necrose e hemorragia intramuscular. Estas alterações poderiam corresponder às zonas de coloração mais escura encontradas nos animais deste estudo, contudo devido à falta de análise histopatológica dos tecidos não se pode confirmar. A presença

de descolorações esbranquiçadas pode ser devida a zonas de fibrose, de regeneração de hemorragias intramusculares anteriores.

Por último a congestão das veias coronárias pode não estar directamente relacionada ao efeito dos rodenticidas, mas sim à hipoxia severa que estes três indivíduos poderiam sofrer devido à congestão/hemorragia pulmonar anteriormente descrita (Smith *et al*, 1992)

Sistema Hemopoiético

O baço de alguns dos animais positivos apresentava alterações de carácter congestivo.

Apesar de não observado neste estudo, estão descritos, uma vez mais em pacientes humanos sujeitos a terapia anticoagulante com warfarina, casos de ruptura espontânea do baço (num dos casos acompanhada de ruptura do fígado) (Kapan *et al* 2005; Soyer *et al* 1976).

Sistema Nervoso Central

Aquando da avaliação do crânio e cérebro foi observado a presença de hematomas na caixa craniana acompanhada de uma congestão cerebral generalizada, em alguns casos severa, num número muito significativo de animais positivos. Na literatura aparecem descritas alterações cerebrais em ratos com alterações comportamentais após intoxicação por rodenticidas anticoagulantes, contudo não são especificadas (Cox e Smith, 1992). Relativamente aos pacientes humanos a patologia mais vezes relacionadas com a warfarina é a hemorragia intracerebral, uma complicação muito grave que muitas vezes conduz à morte (Appelboam e Thomas, 2009; Rosand *et al*, 2004). A congestão cerebral apresentada nos animais positivos pode estar relacionada com a hipoxia ou também como uma fase prévia à hemorragia.

Na Tabela 6 são apresentados conjuntos de sinais clínicos gerais das alterações apresentadas nos sistemas anteriormente referidos que se apresentam descritos na literatura (Coles, 2007; Harrison e Ligthfoot, 2006). Na maioria dos casos são apresentados sintomas não específicas uma vez que não se pode afirmar com exactidão o tipo de alteração apresentado.

Tabela 6. Sintomas provocados pelas alterações nos diferentes órgãos e sistemas.

Hemorragia Pulmonar	Dispneia Debilidade Anorexia Depressão Febre Cianose Síncope
Enterite Hemorrágica	Desidratação Depressão Debilidade Emaciação Hematemese Melena Anemia
Alteração Hepática	Anorexia Letargia Debilidade Diarreia Mau estado da plumagem Dispneia Melena
Alterações Cardíacas	Debilidade Letargia Dispneia Intolerância ao exercício
Alterações Renais	Desidratação Depressão Debilidade Anorexia Distúrbios Convulsivos Diminuição da massa muscular
Alterações Sistema Nervoso	<u>Alterações Cerebrais:</u> Estado mental alterado Distúrbios convulsivos Alterações comportamentais Cegueira <u>Alterações cerebelo:</u> Ataxia Dismetria Tremores da cabeça

Apesar destas alterações não podemos afirmar que os animais positivos a brodifacume ou bromadiolona estiveram sujeitos a todos estes sintomas e todos com o mesmo nível de severidade. Também, e após análise dos

resultados das necrópsias, não foi detectado contudo, observámos que estes animais se encontravam num estado de debilidade geral, suportado por exemplo pela correlação positiva entre uma condição corporal baixa e o resultado positivo à análise destes tóxicos.

Kaukeinenn (1982) refere que em virtude dos animais em liberdade terem à sua disposição um elevado espectro de presas, a ingestão de animais intoxicados por rodenticida numa dose que não seja letal pode causar apenas alterações transitórias, que se extinguem a partir do momento em que os valores de protrombina voltem ao normal. Outros autores descrevem alterações a nível comportamental acompanhadas de tempos de protrombina alterados, em aves de rapina mantidas em cativeiro e expostas a níveis sub-letais de rodenticidas, que contudo desaparecem quando os valores de protrombina atingem novamente valores normais (Primus *et al*, 2001).

Apesar de existir a possibilidade de reversão dos sintomas nos casos em que as alterações orgânicas não sejam severas, não podemos esquecer que os animais analisados neste estudo se encontravam em liberdade e que assim qualquer estado de debilidade nestes ambientes representa um risco à sua sobrevivência. Sabe-se também que o stress resultante das lesões sofridas pelas aves faz com que aumente o seu limiar de dor (Coles, 2007); tal pode provocar uma tentativa de manutenção (mesmo que não efectiva) dos seus comportamentos normais, aumentando o risco de outros tipos de causa de mortalidade, como são os traumas.

Uma vez que não foram realizados estudos histopatológicos aos órgãos alterados, não podemos afirmar que as alterações encontradas se devem exclusivamente à presença destes xenobióticos no organismo. Contudo, e devido às correlações encontradas entre os diversos parâmetros analisados, podemos colocar a hipótese de possível existência de uma relação entre ambos.

No que diz respeito ao caso específico das causas de ingresso, observámos que existe uma maior incidência de trauma contra estrutura entre os animais positivos. Os animais que se englobam dentro desta categoria, entraram no hospital GREFA, após colisões contra janelas, paredes, entre outras. Esta predominância deste tipo de trauma nos animais positivos poderá estar relacionada com as alterações cerebrais encontradas, apesar de não podermos afirmar com certeza devido à carência dos estudos histopatológicos anteriormente referidos.

Apesar do trauma contra estrutura ser a causa de maior incidência nos animais positivos, aparece também nestes animais com uma frequência elevada, outros tipos de trauma (trauma desconhecido), assim como sintomas não

específicos, incluídos na causa de ingresso doença, como é o caso de animais cegos ou com sintomatologia nervosa. Os animais negativos incluídos neste grupo não apresentavam este tipo de alterações, mas sim processos de origem bacteriana, vírica ou parasitária, destacando-se de forma clara a Tricomoníase. Nenhuma destas alterações foi encontrada em animais positivos. Tal como referido anteriormente não podemos assegurar que os processos encontrados nos animais positivos estejam relacionados directamente aos rodenticidas. Supõe-se que, devido às lesões encontradas à necrópsia, sintomatologia associada e a correlação estatística encontrada, pode existir uma relação entre presença de rodenticida e a ocorrência de alterações sub-letais que possam conduzir à morte por causas indirectas, como por exemplo o golpe contra ventana, dos animais analisados.

Uma última questão refere-se à presença de sangue nas fezes ou a partir de outras cavidades corporais, como narinas, boca, ouvidos. Estas alterações acompanhadas de debilidade podem também aumentar a susceptibilidade das aves de rapina analisadas a serem predadas.

Utilização da CCF na detecção de Brodifacume e Bromadiolona

A CCF é a técnica utilizada na detecção destes dois compostos no Laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Como referido anteriormente esta técnica apresenta inúmeras vantagens principalmente no que diz respeito à facilidade de execução e ao ponto de vista económico. A possibilidade de poder fazer a análise dos dois compostos ao mesmo tempo e em alguns casos em mais do que um animal, torna esta técnica um meio de detecção bastante expedito.

Contudo, existem também um número de limitações que, no caso específico deste trabalho, podem ter sido importantes nos resultados obtidos. As amostras biológicas utilizadas, foram em muitos casos de dimensões pequenas, atingindo os valores, em alguns casos, de fígados com peso inferior a 5 g. Tal facto pode conduzir a uma extracção dos compostos em quantidade insuficiente para a posterior detecção dos mesmos. Em apenas alguns casos (2) foi realizado um “pool” de amostra em que para à maceração do fígado, foram adicionados os rins do mesmo animal. Este processo, uma vez que se sabe que o fígado é o órgão de maior concentração destes xenobióticos assumindo os outros órgãos um papel muito menos importante, pode conduzir a uma diluição dos mesmos, dificultando a sua detecção.

Tal como foi referido, aquando da explicação dos métodos mais utilizados, a CCF não possui uma sensibilidade elevada na detecção de doses sub-letais destes compostos. Esta condicionante foi confirmada com o facto de aparecerem animais positivos quando analisados por Cromatografia Gasosa, em situações que eram duvidosas e que em alguns casos pareciam negativas a CCF.

Outra limitação ao trabalho laboratorial foi a impossibilidade de realização da quantificação do xenobiótico no animal, o que poderia ter fornecido outro tipo de informação importante na análise dos resultados.

6.5 Conclusão

Os resultados obtidos com este trabalho demonstram uma vez mais que os compostos rodenticidas anticoagulantes de segunda geração continuam a surgir como um problema para as aves de rapina selvagens devido a envenenamento secundário, aparecendo, neste caso, a bromadiolona como o tóxico mais vezes envolvido.

É importante realçar que neste estudo não foi utilizada uma amostra populacional proveniente de uma área que tivesse sofrido um controlo programado, de larga escala, de roedores através de um composto pré-determinado. Todos estes animais chegaram ao GREFA provenientes de diferentes pontos da Comunidade de Madrid estando expostas de forma espontânea aos rodenticidas analisados.

Foi observado que não são apenas os hábitos alimentares das aves de rapina um factor de risco para a sua exposição aos rodenticidas. Também o habitat utilizado representa um factor muito importante nesta exposição. Estas variáveis poderão ser distintas noutras regiões de estudo, contudo no caso concreto animais positivos analisados, as áreas mistas de elevados nível populacional, rodeadas por bosques e por pequenas zonas de cultivo, parecem ser as mais problemáticas.

Relativamente a possíveis efeitos sub-letais, foram observadas correlações significativas entre alguns parâmetros e a intoxicação por estes xenobióticos, nomeadamente condição corporal baixa, congestão pulmonar, cerebral, alterações intestinais e cardíacas. Quanto à causa de ingresso a mais significativa nos animais positivos foi o trauma contra estruturas. Contudo, o relativo baixo número de amostras não possibilitou uma análise mais consistente e significativa entre os mesmos.

Este trabalho fornece novos dados e novas questões sobre um problema muito pouco estudado, como são os efeitos sub-letais destes compostos. Pretende-se assim, que a partir destes resultados possam ser realizados novos estudos, mais sensíveis, envolvendo um maior número de animais e acompanhados de análises histopatológicas dos órgãos afectados, para que se possam estudar, de forma mais precisa os efeitos sub-letais nestas espécies animais. Com efeito a percentagem de animais que sofrem uma morte directa por estes compostos, pode apenas ser a “ponta do iceberg”.

7. BIBLIOGRAFIA

- Allen, A.M., Hansen, C.T., Moore, T.D., Knapka, J., Ediger, R.D. & Long, P.H. (1991). Hemorrhagic cardiomyopathy and hemotorax in vitamin k deficient mice. *Toxicologic Pathology*. 19(4), Part 2, 589-596.
- Amitrano, L., Guardascione, M.A., Balzano, A., Brancaccio, V., Iannaccone, L. & Ames, P.R.J. (2003). Unusual liver damage ensuing after warfarin administration in a pregnant woman with caval thrombosis. *Digestive and Liver Disease*. 35, 61-65 (Correspondence).
- Appelboom, R. & Thomas, E.O. (2009). Warfarin and intracranial haemorrhage. *Blood Reviews*. 23, 1-9.
- Barnes, C., Newall, F., Ignjatovic, V., Wong P., Cameron, F., Jones, G. & Monagle, P. (2005). Reduced bone density in children on long-term warfarin. *Pediatric Research*. 57(4), 578-581.
- Berny, P.J., Buronfosse, T., Buronfosse, F., Lamarque, F. & Lorgue G. (1997). Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*. 35(8), 1817-1829.
- Booth, L.H., Fisher P., Heppelthwaite, V. & Eason, C.T. (2003). Toxicity and residues of brodifacoum in snails and earthworms. *DOC Science Internal Series* 143. Wellington, Department of Conservation.
- Booth, S.L. & Mayer, J. (2000). Warfarin use and fracture risk. *Nutrition Reviews*. 58(1), 20-22.
- Bowie, M.H. & Ross, J.G. (2006). Identification of weta foraging on brodifacoum bait and the risk of secondary poisoning for birds on Quail Island, Canterbury, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology*, 30(2), 219-228.
- Brakes, C.R. & Smith, R.H. (2005). Exposure of non-target small mammals to rodenticides: Short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *Journal of Applied Ecology*, 42, 118-128.
- Breckenridge, A.M., Cholerton, S., Hart, J.A., Park, B.K. & Scott, A.K. (1985). A study of the relationship between the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the 4-hydroxycoumarin anticoagulants warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit. *British Journal of Pharmacology*. 84(1), 81-91.
- Brown, L., Amadon, D. (1968). Eagles, hawks and falcons of the world: Volume 2. New York: McGraw-Hill.
- Brown, P.R. & Singleton, G.R. (1998). Efficacy of brodifacoum to control house mice, *Mus domesticus*, in wheat crops in southern Australia. *Crop protection*. 17(4), 345-352.
- Carrapiço, A.L., Rodrigues, A.M., São Braz, B., & Silva, A.J. (2006). Poisoning monitoring plan: preliminary results. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 29 (Suppl 1), 346.

- Carballo, P.J., Gabriel, S.E., Castro, M.R., Atkinson, E.J. & Melton III, L.J. (1999a). Changes in bone density after exposure to oral anticoagulants: a meta-analysis. *Osteoporosis International*. 9, 441-448.
- Carballo, P.J., Heit, J.A, Atkinson, E.J., Silverstein, M.D., O'Fallon, W.M., Castro, R.M. & Melton III, J.L. (1999b). Long- term use of oral anticoagulants and the risk of fracture. *Achieves of Internal Medicine*. 159, 1750-1756.
- Chace, J. F. & Walsh, J.J. (2006). Urban effects on native avifauna: a review. *Landscape and urban planning*. 74, 46-69.
- Coles, B.H. (2007). Essentials of avian medicine and surgery. (3th ed.). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Cox, P., & Smith, R.H. (1992). Rodenticide ecotoxicology: Pre-Lethal effects of anticoagulant on rat behaviour. In J.E. Borrecco & R.E. Marsh (Eds), *Proceedings of the 15th Vertebrate Pest Conference, University of Nebraska, Lincoln, 1992*, University of California, Davis, Publication, pp.165-170.
- Dannaci, M., Kesici, G.E., Kesici, H., Polat, C. & Belet, U. (2006). Coumadin-induced renal and retroperitoneal hemorrhage. *Renal Failure*. 28, 129-132.
- Davies, R.R. (2000). Avian liver disease: Etiology and pathogenesis. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 9(3), 115-125.
- Del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. (Eds.). (1994). *Handbook of the birds of the world (Volume 2): New world vultures to Guinea fowl*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Del Moral, J.C, Molina, B., De la Puente, J. & Pérez-Tris, J. (2002). Atlas de las Aves de Invernantes de Madrid 1999-2001. Madrid: Seo Monticola y Comunidad de Madrid
- Delibes, M., Brunet-Lecomte, P. & Mañez, M. (1984). Datos sobre la alimentación de la lechuza común (*Tyto alba*), el búho chico (*Asio otus*) y el Mochuelo (*Athene noctua*) en una misma localidad de Castilla la Vieja. *Ardeola*. 30, 57-63.
- Dirección General de Promoción y Disciplina Ambiental, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid. (2006). *CARTANET general*. Acedido em Ago. 10, 2009, disponível em: http://medioambiente.org/webma/cartografia/viewer.htm?TITLE=GENERAL&MAPSERVICE=f_general&OVMAPSERVICE=f_pajaro&ACTLAYERINDEX=8&STARTLEFT=0&STARTBOTTOM=0&STARTRIGHT=0&STARTBOTTOM=0&TYPEAPPLICATION=1.
- Dirección General de Promoción y Disciplina Ambiental, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid. (2006). *CARTANET medio natural*. Acedido em Ago. 10, 2009, disponível em: http://medioambiente.madrid.org/webma/cartografia/viewer.htm?TITLE=MedioNatural&MAPSERVICE=f_medionatural&OVMAPSERVICE=f_pajaro&ACTLAYERINDEX=12&STARTLEFT=0&STARTBOTTOM=0&STARTRIGHT=0&STARTTOP=0&TYPEAPPLICATION=1.

- Donázar, J.A. (1988) Selección del hábitat de nidificación por el búho real (*Bubo bubo*) en Navarra. *Ardeola*. 35(2), 233-245.
- Donázar, J.A. (1989). Variaciones geográficas y estacionales en la alimentación del búho real (*Bubo bubo*) en Navarra. *Ardeola*. 36(1), 25-39.
- Eason, C.T. & Spurr, E.B. (1995a). Review of the toxicity and the impacts of brodifacoum on non-target wildlife in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 22, 371-379.
- Eason, C.T. & Spurr, E.B. (1995b). The toxicity and sub-lethal effects of brodifacoum in birds and bats: A literature review. *Science for Conservation*, 6, Department of Conservation, Wellington, New Zealand, Publication.
- Eason, C.T., Milne, L., Potts, M., Morriss, G., Wright, G.R.G. & Sutherland, O.R.W. (1999). Secondary and tertiary poisoning risks associated with brodifacoum. *New Zealand Journal of Ecology*, 23(2), 219-224.
- Eason, C.T., Murphy, E.C., Wright, G.R.G. & Spurr, E.B. (2002). Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology*, 11, 35-48.
- Eason, C.T., Wright, G.R.G., Milne, L.M. & Morriss, G.A. (2001). Laboratory and field studies of brodifacoum residues in relation to risk exposure to wildlife and people. In Department of Conservation. Literature review of the acute toxicity and persistence of brodifacoum to invertebrates and studies of residue risks to wild life and people. *Science for Conservation 117B*, pp 11-23.
- Erikson, W. & Urban, D. (2004). Potencial risks of nine rodenticides to birds and nontarget mammals: A comparative approach. Office of prevention, pesticides and toxic substances. United States Environmental Protection Agency, Washington D.C.
- Fargallo, J., A., Padilla-Martínez, J., Viñuela, J., Torre., G., I., Vergara, P. & De Neve, L. (2009). Kestrel-prey dynamic in a mediterranean region: The generalist predation and climatic factors. *PLoS ONE*. 4(2), Article e4311. Acedido em Ago. 29, disponível em <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0004311>.
- Feldman, F.B., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. (2000). Veterinary hematology. (5th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fernández-Llario, P. & Hidalgo de Trucios, S.J. (1995). Importancia relativa de presas con limitaciones físicas en la dieta del buho real, *Bubo bubo*. *Ardeola*. 42(2), 205-207.
- Fisher, P., O'Connor, G., Wright G., & Eason T. C. (2003). Persistence of four anticoagulant rodenticides in the liver of laboratory rats. *DOC Science Internal Series 139*. Department of Conservation, Wellington.
- Fisher, P.M. (2009). Residual concentrations and persistence of the anticoagulant rodenticides brodifacoum and diphacinone in fauna. Doctoral dissertation. Lincoln: Lincoln University.

- Godfrey, M.E.R., (1986) An evaluation of the acute oral toxicity of brodifacoum to birds. In T.P. Salmon (Ed), *Proceedings of the 12th Vertebrate Pest Conference, University of Nebraska, Lincoln, 1986*, University of California, Davis, Publication, pp.78-81.
- González, A. G., & Ortí, F.C. (2001). Notas sobre la variación estacional y geográfica de la dieta del búho chico, *Asio otus*. *Ardeola*. 2001, 75-80.
- Guan, F., Ishii, A., Seno, H., Watanabe, K., Kumazawa, T. & Suzuki, O. (1999). A method for simultaneous determination of five anticoagulant rodenticides in whole blood by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 21, 179-185.
- Gundberg, C.M., Nieman, S.D., Abrams, S. & Rosen, H. (1998). Vitamin k status and bone health: an analysis of methods for determination of undercarboxylated osteocalcin. *Journal of Clinical Endocrinology and metabolism*. 83(9),3258-3266.
- Gupta, R.C. (2007). Veterinary toxicology. Basic and clinical principles. Oxford: Elsevier Inc. Academic Press.
- Harrison, G.J. & Lightfoot, T.L. (2006). Clinical avian medicine (Volume I). Palm Beach: Spix Publishing Inc.
- Hedgal, P.L. & Blaskiewicz, R.W. (1984). Evaluation of the potencial hazard to Barn Owls of Talon (Brodifacoum bait) used to control rats and house mice. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3, 167-179
- Hedgal, P.L. & Colvin, B.A. (1988). Potencial hazard to Eastern Screech-Owls and other raptors of brodifacoum bait used for vole control in orchards. *Enviromental Toxicology and Chemestry*, 7, 245-260.
- Hernández, L.H. & Pérez, C.G. (2002). Introducción al análisis instrumental. Barcelona: Editorial Ariel S.A.
- Hoare, J.M. & Hare, K.M. (2006). The impact of Brodifacoum on non-target wildlife: Gaps in knowledge. *New Zealand Journal of Ecology*, 30(2), 157-167.
- Howald, G.R., Mineau, P., Elliot J.E. & Cheng, K.M. (1999). Brodifacoum poisoning of avian scavengers during rat control on a Seabird colony. *Ecotoxicology*, 8(6), 431-447.
- Jones, A., (1996). HPLC determination of anticoagulant rodenticide residues in animal livers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 56, 8-15.
- Kaira, K., Takei, Y., Matsuura, M. & Saito, R. (2003). Pulmonary hematoma resulting of anticoagulant therapy. *American Journal of Roentgenology*, (180), 1740.
- Kapan, M., Kapan, S., Karabicak, I. & Bavunoglu, I. (2005). Simultaneous rupture of the liver and spleen in a patient on warfarin therapy: Report of a case. *Surgery Today*. 35, 252-255.
- Kaukeinen, D., (1982). A review of the secondary poisoning hazard potencial to wildlife from the use of anticoagulant rodenticides. In R.E. Marsh (Ed),

Proceedings of the 10th Vertebrate Pest Conference, University of Nebraska, Lincoln, 1982, University of California, Davis, Publication, pp.151-158.

Kenward, R.E. (1978). Hawks and doves: Factors affecting success and selection in goshawk attacks on woodpigeons. *Journal of animal ecology*. 47, 449-460.

Khandpur, R.S. (2007). Handbook of analytical instruments. New York: McGraw-Hill Companies Inc.

Knooper, L.D., Mineau, P., Walker, L.A. & Shore, R.F. (2007). Bone density and breaking in UK raptors exposed to second generation anticoagulant rodenticides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 78, 249-251.

Kohn, B., Weingart, C. & Giger, U. (2003). Haemorrhage in seven cats with suspected anticoagulant rodenticide intoxication. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5, 295-304.

Lambert, O., Pouliquen, H., Larhantec, M., Thorin, C. & L'Hostis, C. (2007). Exposure of raptors and waterbirds to anticoagulant rodenticides (Difenacoum, bromadiolone, coumatetralyl, coumaten, brodifacoum): Epidemiological survey in Loire Atlantique (France). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79, 91-94.

Lindström, A., Kvist, A., Piersma, T., Dekinga, A. & Dietz, M.W. (2000). Avian pectoral muscle size rapidly tracks body mass changes during flight, fasting and fuelling. *Journal of Experimental Biology*, 203 (5): 913-919.

Lopez-Gordo, J.L., Lazaro, E. & Fernandez-Jorge, A. (1977). Comparación de las dietas de *Strix aluco*, *Asio otus* y *Tyto alba* en un mismo biótopo de la provincia de Madrid. *Ardeola*, 23, 189-221.

Maimon, N., Penner, T. & Demajo, W. (2006). Warfarin-induced gastric bleeding and intestinal obstruction. *European Journal of Internal Medicine*, 17, 211-212.

Mañosa, S. & Oro, D. (1991). Contribución al conocimiento de la dieta del gavilán *Accipiter nisus* en la comarca de la Segarra (Cataluña) durante el período reproductor. *Ardeola*, 38(2), 289-296.

Mareck, J.L. & Koskinen, W.C. (2007). Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 571-576.

Maurer, H.H. & Joachim, W.A. (1998). Detection of 4-hydroxycoumarin anticoagulants and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas chromatography-mass spectrometry after extractive methylation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 714(2), 181-195.

Mellado, V.P. (1980). Alimentacion del búho real (*Bubo bubo*) en España central. *Ardeola*, 26, 98-112.

- Meunier, F.D., Verheyden, C. & Jouventin, P. (2000). Use of roadsides by diurnal raptors in agricultural landscapes. *Biological Conservation*, 92 (3), 291-298.
- Mikkola, H. (1995). Rapaces Nocturnas de Europa. Lleida: Editorial Perfls.
- Moller, A.P. & Erritzoe, J. (2000). Predation against birds with low immunocompetence. *Oecologia*, 122, 500-504.
- Munday, J.S. & Thompson, L.J. (2003). Brodifacoum toxicosis in two neonatal puppies. *Veterinary Pathology*, 40, 216-219.
- Murray, D.L. (2002). Differential body condition and vulnerability to predation in snowshoe hares. *Journal of Animal Ecology*, 71, 614-625.
- Murray, M. & Tseng, F. (2008). Diagnosis and treatment of secondary anticoagulant rodenticide toxicosis in a red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 22(1), 41-46.
- Newton, I., Wyllie, I. & Dale, L. (1997). Mortality causes in British Barn Owls on 1.101 carcasses examined during 1963-1966. In: Duncan, James R.; Johnson, David H.; Nicholls, Thomas H., eds. Biology and conservation of owls of the Northern Hemisphere: 2nd International symposium. Gen. Tech. Rep. NC-190. St. Paul, MN: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, North Central Forest Experiment Station. 299-307.
- O' Malley, B. (2005). Clinical anatomy and physiology of exotic species. Oxford: Elsevier Limited.
- Olea, P.P. & Mateo-Tomás, P. (2009). The role of traditional farming practices in ecosystem conservation: the case of transhumance and vultures. *Biological conservation*, 142, 1844-1853.
- Olea, P. P., Sánchez-Barbudo, I.S., Viñuela, J., Barja, I., Mateo-Tomás, P., Piñeiro, A., Mateo, R. & Purroy, F.J. (2009). Lack of Scientific evidence and precautionary principle in massive release of rodenticides threatens biodiversity: Old lessons and new reflections. *Environmental Conservation*, 36, 1-4.
- Ong, H.S. (2007). Compressive femoral neuropathy: A rare complication of anticoagulation. *Singapore Medical Journal*, 48(3), 94-95.
- Ortego, J. (2007). Consequences of eagle owl nest-site habitat preference for breeding performance and territory stability. *Ornis Fennica*, 84, 78-90.
- Padial, J.M., Barea, J.M., Contreras, F.J., Ávila, E. & Pérez, J. (1998). Dietas del Azor común (*Accipiter gentilis*) en las sierras béticas de Granada durante el período de reproducción. *Ardeola*, 45(1), 55-62.
- Palazoglu, M.G., Tor, E.R., Holstege D.M. & Galey, F.D. (1998). Multiresidue analysis of nine anticoagulant rodenticides in serum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4260-4266.
- Palomino, D. & Carrascal, L.M. (2006). Urban influence on birds at a regional scale: A case study with the avifauna of northern Madrid province. *Landscape and Urban Planning*, (77), 276-290.

- Papagiannis, A., Smith A.P. & Hebden, M.W. (1995). Acute dyspnea, chest tightness, and anemia in a 33- year old man. *Chest*, 107, 863-865.
- Parra, J. & Tellería, J.L. (2004). The increase in the spanish population on griffon vulture (*Gyps fulvus*) during 1989-1999: Effects of food and nest site availability. *Bird Conservation International*, 14, 33-41.
- Penteriani, V., Delgado, M.M, Bartolommei, P., Maggio, C., Alonso-Alvarez, C. & Holloway, G.J. (2008). Owls and rabbits: Predation against substandard individuals of an easy prey. *Journal of Avian Biology*, 39, 215-221.
- Pérez, V.M. (1980). Alimentación del búho real (*Bubo bubo* L.) en España central. *Ardeola*, 25, 98-117.
- Peterson, R., Mountfort, G., Hollom, P.A.D. (1991). Guía de Campo de las Aves de España y de Europa (4ª edición). Barcelona: Ediciones Omega.
- Polat, C., Dervisoglu, A., Guven, H., Kaya, E., Malazgirt, Z., Danaci, M. & Ozkan K. (2003). Anticoagulant-induced intramural intestinal hematoma. *American Journal of Emergency Medicine*, 21(3), 208-211.
- Price, P.A. & Williamson M.,K. (1981). Effects of warfarin on bone. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(24), 12754-12759.
- Price, P.A. & Sloper, S.A. (1982). Concurrent warfarin treatment further reduces bone mineral levels in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated rats. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(10), 6004-6007.
- .Price,P.A., Williamson M.K., Haba, T., Dell, R.B. & Jee, W.S.S. (1982). Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc.Natl.Acad.Scie.*, 79, 7734-7738.
- Primus, T.M. Eisemann, J.D., Matschke, G.H., Ramey ,C. & Jonhston, J.J. (2001). Chlorophacinone residues in rangeland rodents: An assessment of the potential risk of secondary toxicity to scavengers. *USDA National Wildlife Research Center*. University of Nebraska: Lincoln.
- Record, R.C. & Marsh R.E, (1988). Rodenticide residues in animal carcasses and their relevance to secondary hazards. In A.C. Crabb e R.E. March (Eds.), *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, Univ. of California, Davis, 1988*, 13, 163-168.
- Rengel, I. & Friedrich, A. (1993). Detection of anticoagulant rodenticides (4-Hydroxycoumarins) by thin-layer chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Veterinary Research Communications*, 17, 421-427.
- Robinson, N.H., Twigg, L.E., Wheeler, S.H. & Martin, G.R. (2005). Effect of the anticoagulant, pindone, on the breeding performance and survival of merino sheep, *Ovis aries*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B*, 140, 465-473.
- Rosand, J., Eckman, M.H., Knudsen, K.A., Singer, D.E. & Greenberg, S.M. (2004). The effect of warfarin and intensity of anticoagulant outcome of intracerebral hemorrhage. *Archives of Internal Medicine*, 164, 880-884.

- Sage, M., Coeurdassier, M., Defaut, R., Gimbert, F., Berny, P. & Giradoux, P. (2008). *Kinetics of bromadiolone in rodent populations and implications for predators after field control of the water vole, Arvicola terrestris*. The Science of the total environment, 407(1):211-22.
- Singh, A.K., Kumar, R., Singhal, L.K. & Chauhan, R.S. (2003). Bromodialone reduces cell-mediated immunity in chickens. *British Poultry Science*, 44 (1), 34.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. & Nieman, T.A. (2001). Principios de analisis instrumental (Quinta edición). Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de españa S.A.U.
- Smith, R.H., Cox, P.R & Rampaud, M. (1992). Rodenticide Ecotoxicology: Systems analysis and simulation. In L.R. Davis & R.E. March (Eds), *Proceedings os the 14th Vertebrate Pest Conference*, University of Nebraska, Lincoln, 1990, University of California, Davis, Publication, pp.47-54.
- Soyer, M.T., Merck, D.E. & Aldrete, J.S. (1976). Spontaneous rupture of the spleen. An unusual complication of anticoagulant therapy. *Archives of Surgery*, 115(5), 610 (Abstract).
- Spurr, E.B., Maitland, M.J., Taylor, G.E., Wright, G.R.G, Radford, C.D & Brown, L.E. (2005). Residues of brodifacoum and other anticoagulant pesticides in target and non-targe species, Nelson Lakes National Park, New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 32, 237-249.
- Stephenson, B.M., Minot, E.O. & Armstrong, D.P. (1999). Fate of moreporks (*Ninox novaeseelandiae*) during a pest control operation on mokoia island, lake rotorua, north island, new zealand. *New Zealand Journal of Ecology*, 23(2), 233-240.
- Stone, W.B., Okoniewski J.C. & Stedelin J.R. (1999). Poisoning of wildlife with anticoagulant rodenticides in New York. *Journal of Wildlife Diseases*, 35(2), 187-193.
- Stone, W.B., Okoniewski J.C. & Stedelin J.R. (2003). Anticoagulant rodenticides and raptors: Recent findings from New York, 1998-2001. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 34-40.
- Uncini, A., Tonali, P., Falappa, P. & Danza, F.M.(1981). Femoral neuropathy from iliacal muscle hematoma induced by oral anticoagulation therapy. *Journal of Neurology*. 226(2), 137-141.
- Vandenbroucke, V., Desmet, N., Backer, P. & Croubels, S. (2008). Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined wiyh heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 869, 101-110.
- Verdejo, J. (1994). Datos sobre la reproducción y alimentación del azor (*Accipiter gentilis*) en un área mediterrânea. *Ardeola*, 41(1), 37-43.
- Walker, L.A., Turk, A., Long, S.M., Wienburg, C.L., Best,J. & Shore, R.F. (2008). Second generation anticoagulant rodenticides in tawny owls (*Strix aluco*) from Great Britain. *Science of Total Environment*, 392(1), 93-98.

- Wittow, G.C. (2000). Sturkie's avian physiology. (5th ed.) San Diego: Academic Press.
- World Health Organization (1995). Anticoagulant rodenticides- environmental health criteria 175. Geneva: International Program on Chemical Safety.
- Zamorano, E., Palomo, L.J., Antúnez, A. & Vargas, J.M. (1986). Critérios de predación selectiva de *Bubo bubo* y *Tyto alba* sobre *Rattus*. *Ardeola*, 33(1-2), 3-9.
- Zuberogoitia, I., Martínéz, J.E., Martínéz, J.A., Zabala, J., Calvo, J.F., Castillo, I., Azkona, A., Iraeta, A. & Hidalgo, S. (2006). Influence of management practices on nest site habitat selection, breeding and diet of the common buzzard, *Buteo buteo*, in two different areas in Spain. *Ardeola*, 53(1): 83-98.

ANEXO A1. Resultados da Análise Estatística (Tabelas de Contingência e Provas de Chi-quadrado) das Lesões observadas à necrópsia

Tabela a. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis fracturas antigas e resultado.

1

			Esqueleto		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	32	1	33
		% within Resultado	97,0%	3,0%	100,0%
	1	Count	17	3	20
		% within Resultado	85,0%	15,0%	100,0%
Total		Count	49	4	53
		% within Resultado	92,5%	7,5%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,557 ^b	1	,110		
Continuity Correction ^a	1,129	1	,288		
Likelihood Ratio	2,491	1	,114		
Fisher's Exact Test				,145	,145
Linear-by-Linear Association	2,509	1	,113		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,51.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a roenticida

1 = positivo a roenticida.

Esqueleto:

0 = ausência de fracturas antigas

1 = presença de fracturas antigas.

(2) Prova de Chi-quadrado.

Tabela b. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis sistema muscular e resultado.

1

			Muscular		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	31	2	33
		% within Resultado	93,9%	6,1%	100,0%
1		Count	12	8	20
		% within Resultado	60,0%	40,0%	100,0%
Total		Count	43	10	53
		% within Resultado	81,1%	18,9%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	9,370 ^b	1	,002	,004	,004
Continuity Correction ^a	7,284	1	,007		
Likelihood Ratio	9,326	1	,002		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	9,194	1	,002		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,77.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a roenticida

1 = positivo a roenticida.

Muscular:

0 = ausência de alterações nos músculos

1 = presença de alterações nos músculos.

(2) Prova de Chi-quadrado.

Tabela c. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis sistema respiratório e resultado.

1

			Respiratorio		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	21	12	33
		% within Resultado	63,6%	36,4%	100,0%
	1	Count	5	15	20
		% within Resultado	25,0%	75,0%	100,0%
Total		Count	26	27	53
		% within Resultado	49,1%	50,9%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7,438 ^b	1	,006	,010	,007
Continuity Correction ^a	5,973	1	,015		
Likelihood Ratio	7,700	1	,006		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	7,298	1	,007		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,81.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a roenticida

1 = positivo a roenticida.

Respiratório:

0 = ausência de alterações no sistema respiratório

1 = presença de alterações no sistema respiratório.

(2) Prova de Chi-quadrado.

Tabela d. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis sistema cardíaco e resultado.

1

			Cardiovascular		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	31	2	33
		% within Resultado	93,9%	6,1%	100,0%
	1	Count	8	12	20
		% within Resultado	40,0%	60,0%	100,0%
Total		Count	39	14	53
		% within Resultado	73,6%	26,4%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	18,640 ^b	1	,000		
Continuity Correction ^a	15,968	1	,000		
Likelihood Ratio	19,189	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	18,288	1	,000		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,28.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a roenticida

1 = positivo a roenticida

Cardiovascular:

0 = ausência de alterações no sistema cardíaco

1 = presença de alterações no sistema cardíaco

(2) Prova de Chi-quadrado.

Tabela e. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Fígado e resultado.

1

			Alterações Fígado		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	33	0	33
		% within Resultado	100,0%	,0%	100,0%
	1	Count	9	11	20
		% within Resultado	45,0%	55,0%	100,0%
Total		Count	42	11	53
		% within Resultado	79,2%	20,8%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	22,904 ^b	1	,000		
Continuity Correction ^a	19,682	1	,000		
Likelihood Ratio	26,607	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	22,471	1	,000		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,15.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a rodenticida

1 = positivo a rodenticida

Alterações fígado:

0 = ausência de alterações no fígado

1 = presença de alterações no fígado.

(2) Prova de Chi-quadrado.

Tabela f. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Tracto Digestivo e resultado.

1

			Tracto Digestivo		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	30	3	33
		% within Resultado	90,9%	9,1%	100,0%
	1	Count	14	6	20
		% within Resultado	70,0%	30,0%	100,0%
Total		Count	44	9	53
		% within Resultado	83,0%	17,0%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,862 ^b	1	,049	,067	,058
Continuity Correction ^a	2,521	1	,112		
Likelihood Ratio	3,752	1	,053		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	3,789	1	,052		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,40.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a roenticida

1 = positivo a roenticida

Tracto Digestivo:

0 = ausência de alterações no tracto digestivo

1 = presença de alterações no tracto digestivo.

(2) Prova de Chi-quadrado.

Tabela g. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Baço e resultado.

1

			Alterações Baço		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	33	0	33
		% within Resultado	100,0%	,0%	100,0%
	1	Count	17	3	20
		% within Resultado	85,0%	15,0%	100,0%
Total		Count	50	3	53
		% within Resultado	94,3%	5,7%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5,247 ^b	1	,022		
Continuity Correction ^a	2,814	1	,093		
Likelihood Ratio	6,149	1	,013		
Fisher's Exact Test				,049	,049
Linear-by-Linear Association	5,148	1	,023		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,13.

Legenda:

(1) Tabela de contingência

Resultado:

0 = não detectado a roenticida

1 = positivo a roenticida.

Alterações Baço:

0 = ausência de alterações no Baço

1 = presença de alterações no Baço

(2) Prova de Chi-quadrado.

Tabela h. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Rim e resultado.

1			Alterações Rin		Total
			0	1	
	Resultado 0	Count	31	2	33
		% within Resultado	93,9%	6,1%	100,0%
	1	Count	16	4	20
		% within Resultado	80,0%	20,0%	100,0%
	Total	Count	47	6	53
		% within Resultado	88,7%	11,3%	100,0%

2	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,410 ^b	1	,121		
Continuity Correction ^a	1,222	1	,269		
Likelihood Ratio	2,330	1	,127		
Fisher's Exact Test				,184	,135
Linear-by-Linear Association	2,365	1	,124		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,26.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a rodenticida

1 = positivo a rodenticida.

Alterações Rim:

0 = ausência de alterações no Rim

1 = presença de alterações no Rim.

(2) Prova de Chi-quadrado

Tabela i. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Sistema Nervoso e resultado.

1

			Nervoso		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	26	7	33
		% within Resultado	78,8%	21,2%	100,0%
	1	Count	8	12	20
		% within Resultado	40,0%	60,0%	100,0%
Total		Count	34	19	53
		% within Resultado	64,2%	35,8%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8,147 ^b	1	,004	,007	,005
Continuity Correction ^a	6,547	1	,011		
Likelihood Ratio	8,144	1	,004		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	7,993	1	,005		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,17.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a roenticida

1 = positivo a roenticida.

Nervoso:

0 = ausência de alterações no Sistema Nervoso

1 = presença de alterações no Sistema Nervoso

(2) Prova de Chi-quadrado

Tabela j. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Outras hemorragias e resultado.

1

			Outras hemorragias		Total
			0	1	
Resultado	0	Count	31	2	33
		% within Resultado	93,9%	6,1%	100,0%
	1	Count	15	5	20
		% within Resultado	75,0%	25,0%	100,0%
Total		Count	46	7	53
		% within Resultado	86,8%	13,2%	100,0%

2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,897 ^b	1	,048	,090	,062
Continuity Correction ^a	2,420	1	,120		
Likelihood Ratio	3,790	1	,052		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	3,823	1	,051		
N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,64.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

0 = não detectado a rodenticida

1 = positivo a rodenticida

Outras hemorragias:

0 = ausência de outras hemorragias

1 = presença de outras hemorragias

(2) Prova de Chi-quadrado

ANEXO A2. Resultados da Análise Estatística (Tabelas de Contingência e Provas de Chi-quadrado) da relação Causa de Ingresso/Resultado

Tabela k. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Causa de Ingresso e Resultado

1

			Resultado		Total	
			ND	Positivo		
	Causa de Ingresso	Doença	Count	8	6	14
			% within Causa de Ingresso	57,1%	42,9%	100,0%
	Outras	Count	15	3	18	
		% within Causa de Ingresso	83,3%	16,7%	100,0%	
	Trauma contra estrutura	Count	1	5	6	
		% within Causa de Ingresso	16,7%	83,3%	100,0%	
	Trauma Desconhecido	Count	9	6	15	
		% within Causa de Ingresso	60,0%	40,0%	100,0%	
Total	Count	33	20	53		
	% within Causa de Ingresso	62,3%	37,7%	100,0%		

2	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	8,899 ^a	3	,031
Likelihood Ratio	9,313	3	,025
N of Valid Cases	53		

a. 2 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,26.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

ND = não detectado a rodenticida

(2) Prova de Chi-Quadrado

ANEXO A3. Resultados da Análise Estatística (Tabelas de Contingência e Provas de Chi-quadrado) da relação Condição Corporal/Resultado

Tabela I. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Condição Corporal e Resultado

1			Resultado		Total
			ND	Positivo	
	Condição Corporal A	Count % within Condição Corporal	7 100,0%	0 ,0%	7 100,0%
	B	Count % within Condição Corporal	26 56,5%	20 43,5%	46 100,0%
	Total	Count % within Condição Corporal	33 62,3%	20 37,7%	53 100,0%

2		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
	Pearson Chi-Square	4,888 ^b	1	,027		
	Continuity Correction ^a	3,213	1	,073		
	Likelihood Ratio	7,267	1	,007		
	Fisher's Exact Test				,037	,028
	N of Valid Cases	53				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,64.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

ND = não detectado a roenticida.

A= Animais com condição corporal 4 ou 5

B= Animais com condição corporal menor ou igual a 3

(2) Prova de Chi-Quadrado

ANEXO A4. Resultados da Análise Estatística (Tabelas de Contingência e Provas de Chi-quadrado) da relação Sexo e Idade/Resultado

Tabela m. Tabela de contingência 2x2 e prova de Chi-quadrado para as variáveis Condição Sexo e Idade/Resultado

1				Sexo/Idade				Total
				FA	FJ	MA	MJ	
	Resultado	ND	Count	10	8	11	4	33
			% within Resultado	30,3%	24,2%	33,3%	12,1%	100,0%
	Positivo	Count	11	2	3	4	20	
		% within Resultado	55,0%	10,0%	15,0%	20,0%	100,0%	
	Total		Count	21	10	14	8	53
			% within Resultado	39,6%	18,9%	26,4%	15,1%	100,0%

2				Asymp. Sig. (2-sided)
		Value	df	
	Pearson Chi-Square	5,352 ^a	3	,148
	Likelihood Ratio	5,541	3	,136
	N of Valid Cases	53		

a. 3 cells (37,5%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,02.

Legenda:

(1) Tabela de contingência:

Resultado:

ND = não detectado a roenticida

FA= Fêmea adulta

FJ= Fêmea Jovem

MA= Macho Adulto

MJ= Macho Jovem.

(2) Prova de Chi-Quadrado

ANEXO B. Poster apresentado no “11th International Congress of the European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology” (Leipzig, Alemanha)

RODENTICIDE INCIDENCE IN BIRDS OF PREY: PRELIMINARY RESULTS OF PREVALENCE STUDY AND POSSIBLE SECONDARY EFFECTS

F. S. Pereira¹, F. G. Gonzalez² & A. Moreira¹

¹ Sector of Pharmacology and Toxicology, Interdisciplinary Centre of Research in Animal Health (CISA), Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon, Portugal
² GREFA (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat) Veterinary Hospital Director.

INTRODUCTION

The impact of rodenticides in the wildlife, mainly the second generation anticoagulant represented by Brodifacoum and Bromadiolone, has been the topic of several studies in the last decades. The use of these substances has caused and still causes innumerable cases of primary and secondary poisoning, by direct ingestion or by ingestion of poisoned animals. Some studies suggest that exposition to sub-lethal doses of these xenobiotics could cause an “indirect” fatality, due to a bigger predisposition to different kinds of trauma or other pathology. The objective of this work is to evaluate the persistence of these substances in a population that due to the alimentacion source, could be exposed and at risk of suffering sub-lethal effects that could end in the “indirect” death of these animals.

MATERIAL AND METHODS

The sample population in study was all the birds of prey that had entered, since October of 2008 until May 2009, in the rehabilitation centre of GREFA (Grupo de Rehabilitación de Fauna Autóctona y su Hábitat, Madrid, Spain) already dead or that had been dead or sacrificed during the treatment, due to the severity of injuries. For all dead animals, necropsy was performed and organic tissues (liver, heart and kidney) were collected for toxicological analysis. Samples were conditioned in proper containers, refrigerated for conservation. Toxicological analysis has been done in the Laboratory of Pharmacology and Toxicology of the Faculty of Veterinary Medicine of the Technical University of Lisbon. A thin layer chromatography (TLC) methodology has been used. Compounds detection have been performed by spots visualization in TLC plates under UV light (366/254 nm).

RESULTS

Of the 53 animals analyzed 20 (37.3%) were positive. Bromadiolone were detected in most cases (80%). For the analysis of these results we haven't done the separation between animals Brodifacoum positive and Bromadiolone positive, due to the similarity of the toxicodynamics and toxicokinetics of these compounds. With the laboratory results, the necropsy findings and a list of variables: specie, age, sex, body condition and cause of injury, we made different comparative analyses to see the difference between positive and negative animals.

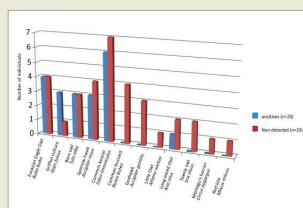


Fig. 2- Results of Brodifacoum and Bromadiolone on the species analyzed.

In relation to the body condition we can see that despite the fact that the average is similar in the positive and negative animals, in the positive ones none of them appeared with a body condition bigger than 3 (considered in GREFA as the normal condition of an animal) while in the negative ones we can see cases of 4 and even 5 (limite of the scale). (Figure 4)

In Figure 5 we see that doesn't exist an important distinction between age and sex in the animals that doesn't have detectable residues of rodenticide. In contrast we see that adult females are predominant in the positive cases.

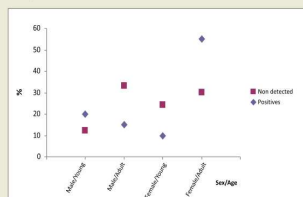


Fig. 5 - Dispersion of the individuals by age/sex between groups (positives and non-detected rodenticide residues).

Of the species analyzed the most affected ones were the Eurasian Eagle Owl (*Bubo bubo*), Griffon Vulture (*Gyps fulvus*), Tawny Owl (*Tyto alba*), Sparrow Hawk (*Accipiter nisus*) and the Common Kestrel (*Falco tinnunculus*). (Figure 2)

The cause of trauma that most affected the positive animals was unknown, despite this the number is similar in the negative ones. However, we can see that trauma against building is predominant in the positive cases while electrocutions, shots and accidents with vehicles occurred more often in negative cases. (Figure 3)

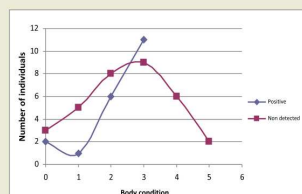


Fig. 4 - Relation of the body condition and results of laboratory analysis (positive or non-detected residues of Brodifacoum and Bromadiolone). Scale of Body condition (Relation keel/pectoral muscles): 0 (cachexy) to 5 (obese).

Analyzing the necropsy findings we see some important differences (Fig. 6). All the parameters observed have more incidence in positive cases, and some of them, like alterations in the liver appearance, congestive liver, some changes in the cardiovascular system and intracelomic hemorrhage are only present in these animals.

DISCUSSION

Due to the fact that this work reflects a preliminary study and it's not completely finished, solid conclusions cannot be taken yet. Although, almost 40% of animals being positive bring to the center GREFA from areas that had not suffered an extensive rodent control, it's a significant number.

We can see through these results that the toxicity of the rodenticides is multifactorial, once species like the Common Buzzard, that due to the animals that includes in its diet, would be more vulnerable, doesn't seem, until now, affected by these compounds and species like the Sparrow Hawk that doesn't have in its diet a large proportion of rodents its moderately affected. The fact that adult females had being more affected by these compounds, may be due to the fact that they are always bigger than the males and so

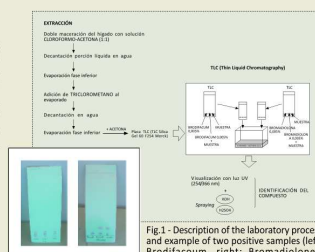


Fig. 1- Description of the laboratory process and example of two positive samples (left: Brodifacoum, right: Bromadiolone).

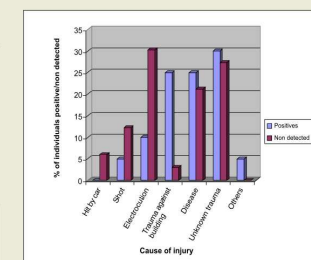


Fig. 3 - Relation between positive-negative results and cause of injury (positive; n=20, non-detected; n=33).

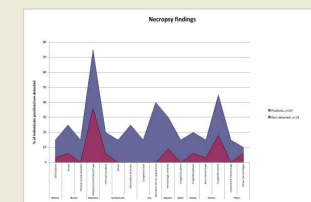


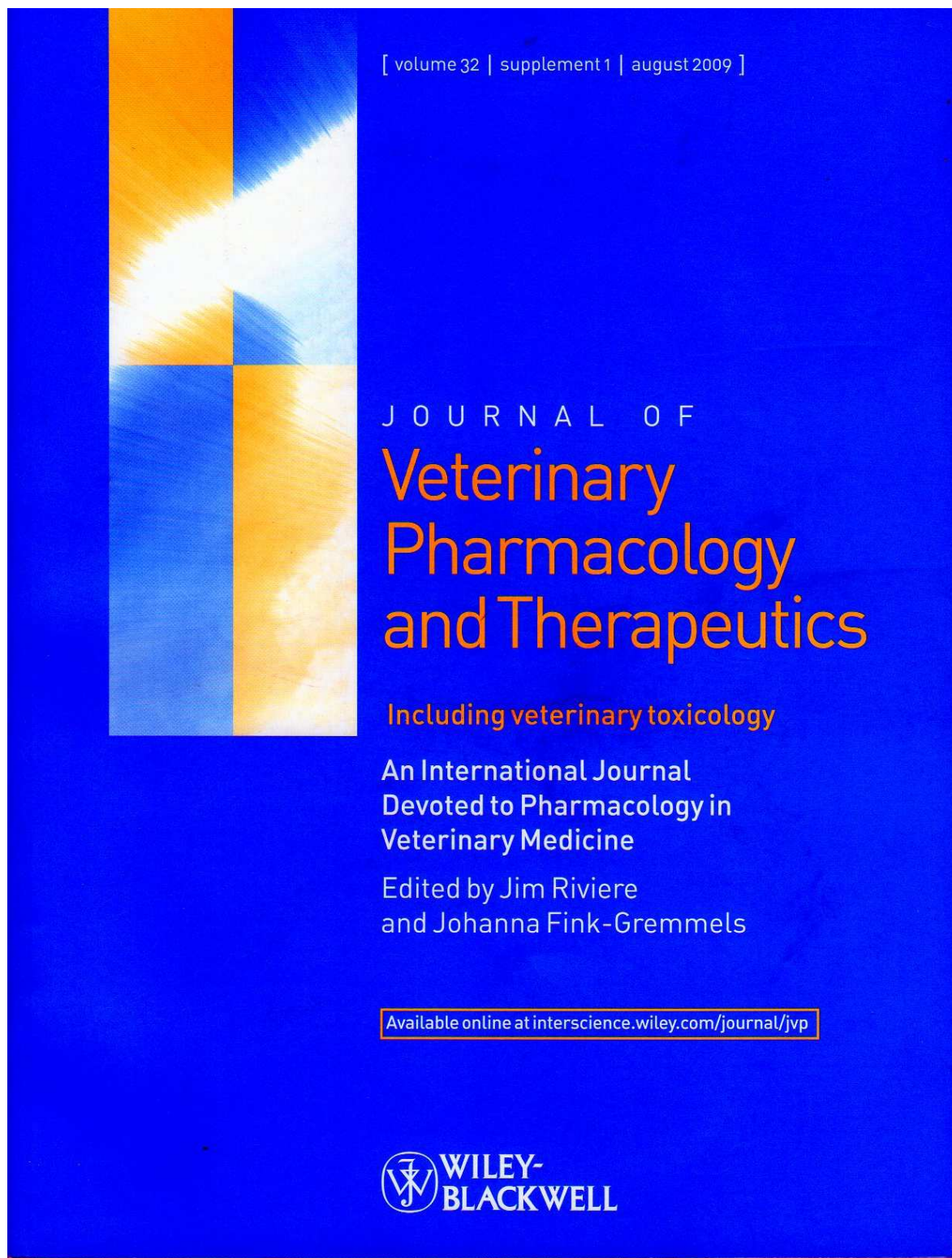
Fig. 6 - Necropsy findings in individuals positive and non-detected rodenticides residues. The values are expressed in percent of individuals in two both samples (positive and non-detected rodenticides residues).

need a bigger food intake, and thus may consume more quantity of Brodifacoum or Bromadiolone.

In relation to the cause of the injuries and necropsy findings, we see that a significant number of animals go against buildings and had in their body lesions that could lead to a situation of more vulnerability to this kind of trauma. The fact of that the positive animals tend to be in a poor body condition is also an important indicator. The relation of these rodenticides and possible secondary effects needs to be structured of a histopathological study that we hope that could be made in the future.

As soon as all the organic samples collected have been analyzed a more consistent analysis of the results would be made.

ANEXO C. Capa da revista científica de publicação e resumo do poster apresentado em “11th International Congress of the European Association of Veterinary Pharmacology and Toxicology” (Leipzig, Alemanha)



RODENTICIDE INCIDENCE IN BIRDS OF PREY: PRELIMINARY RESULTS OF PREVALENCE STUDY AND POSSIBLE SECONDARY EFFECTS

F. S. PEREIRA¹, F. G. GONZALEZ² & A. MOREIRA¹

¹ Sector of Pharmacology and Toxicology, Interdisciplinary Centre of Research in Animal Health (CIISA), Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon, Portugal

² GREFA (Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat) Veterinary Hospital Director.

Introduction

The impact of rodenticides in the wildlife, mainly the second generation anticoagulant represented by Brodifacoum and Bromadiolone, has been the topic of several studies in the last decades. The use of these substances has caused and still causes innumerable cases of primary and secondary poisoning, by direct ingestion or by ingestion of poisoned animals.

Some studies suggest that exposition to sub-lethal doses of these xenobiotics could cause an “indirect” fatality, due to a bigger predisposition to different kinds of trauma or other pathology [1, 2].

The objective of the present study is to assess the relation between the presence/absence of anticoagulant pesticides in animals and other injuries not directly related with a sub lethal intoxication present in those animals.

Material and Methods

The sample population in study was all the birds of prey that had entered, since October of 2008, in the rehabilitation centre of GREFA (Grupo de Rehabilitación de Fauna Autóctona y su Habitat, Madrid, Spain) already dead or that had been dead or sacrificed during the treatment, due to the severity of injuries.

For all dead animals, necropsy was performed and organic tissues (liver, heart and kidney) were collected for toxicological analysis. Samples were conditioned in proper containers, refrigerated for conservation.

Toxicological analysis has been done in the Laboratory of Pharmacology and Toxicology of the Faculty of Veterinary Medicine of the Technical University of Lisbon. A thin layer chromatography (TLC) methodology has been used [3]. Compounds detection have been performed by spots visualization in TLC plates under UV light (366/254 nm)

Results

Table 1. Preliminary results of the toxicological analysis of twelve raptors

Animal	Analyzed tissues	Kind of Trauma	Sex	Cause of Death	Result
Common Kestrel <i>Falco tinnunculus</i>	L, H	Unknown	M	Field	Negative Bf and Bd
Peregrine Falcon <i>Falco peregrinus</i>	L	Shot	M	Euthanized	Negative Bf and Bd
Euroasian Eagle Owl <i>Bubo bubo</i>	L	Electrocution	F	Field	Negative Bf and Bd
Sparrow Hawk <i>Accipiter nisus</i>	L, H	Unknown	F	Field	Not analysed*
Euroasian Eagle Owl <i>Bubo bubo</i>	L	Trauma against building	F	Field	Positive Bf
Little Owl <i>Athene noctua</i>	L, H	Unknown	M	in treatment	Not analysed*
Barn owl <i>Tyto alba</i>	L, H, K	Trauma against building	F	Field	Positive Bf
Sparrow Hawk <i>Accipiter nisus</i>	L, H, K	Trauma against building	M	Euthanized	Positive Bd
Euroasian Eagle Owl <i>Bubo bubo</i>	L	Unknown	F	in treatment	Negative Bf and Bd
Goshawk <i>Accipiter gentilis</i>	L	Electrocution	F	Field	Negative Bf and Bd
Griffon Vulture <i>Gyps fulvus</i>	L	Unknown	F	in treatment	Positive Bf
Griffon Vulture <i>Gyps fulvus</i>	L	Unknown	F	in treatment	Negative Bf and Bd

Legend: * not analysed due to insufficient tissue quantity

Sample – L (liver), H (heart), K (kidney); Sex – M (male), F (female) ; Cause of death – Field (collect dead in the field), Euthanized (during treatment due to severe injuries), in treatment (dead during treatment)

Xenobiotic – Bf (Brodifacoum), Bd (Bromadiolona)

Discussion

Table 1 summarized the results of samples analyzed until the present moment. The figures show that 4 of the 10 animals analysed were positive, representing 40% of the population sample.

At this moment, the cross evaluation between the results of toxicological analysis and the type of injuries do not show any strong association. Nevertheless the number of collected animals increases every day, leading to a sample dimension that, in a few weeks, could show a stronger or different association between the assessed parameters.

One of the goals of this work is to evaluate the persistence of these substances in a population that due to the alimentation source, could be exposed and at risk of suffering sub-lethal effects that could end in the "indirect" death of these animals. The mechanisms and the physiological changes in the organism that lead to the predisposal of trauma aren't the main issue of this pilot study. However, depending on these preliminary results, a complete ecological risk analysis should be a priority in a subsequent work.

Acknowledgements

This work is part of the final academic training of the first author, carried out at **GREFA** under the supervision of Fernando Gonzalez and Anabela Moreira. The Master of Science on Veterinary Medicine dissertation will be presented next semester at the **Faculty of Veterinary Medicine** of the Technical University of Lisbon.

References

1. Hegdal, P.L. and B.A . Colvin. 1988. Potencial Hazard to eastern screech-owls and other raptors of brodifacoum bait used for vole control in orchards. *Environ. Toxicol.Chem* 7 :245-260.
2. Newton, I., R.F.Shore, I.Wyllie, J.D.S Birks, and L.Dale.1999. Empirical evidence of side-effects of rodenticides on some predatory birds and mammals.*Advances in Vertebrate Pest Management*, 347-367
3. Carrapiço *et al.* (2006) *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 29 (suppl. 1), 346.

Anexo D. Matriz de dados

Espécie	Sexo	Idade	Sexo/Idade	Causa de Ingresso	Cond. corporal	Resultado
<i>Falco tinnunculus</i>	F	Adulto	FA	Doença	1	Positivo
<i>Asio otus</i>	F	Adulto	FA	Trauma Desconhecido	3	Positivo
<i>Tyto alba</i>	F	Adulto	FA	Trauma Desconhecido	3	Positivo
<i>Bubo bubo</i>	F	Adulto	FA	Disparo	2	Positivo
<i>Accipiter nisus</i>	F	Adulto	FA	Trauma Desconhecido	3	Positivo
<i>Falco tinnunculus</i>	F	Adulto	FA	Trauma contra estrutura	3	Positivo
<i>Falco tinnunculus</i>	F	Adulto	FA	Outras	3	Positivo
<i>Bubo bubo</i>	F	Adulto	FA	Trauma contra estrutura	2	Positivo
<i>Gyps fulvus</i>	F	Adulto	FA	Doença	3	Positivo
<i>Tyto alba</i>	F	Jovem	FJ	Trauma contra estrutura	3	Positivo
<i>Bubo bubo</i>	M	Adulto	MA	Trauma Desconhecido	0	Positivo
<i>Gyps fulvus</i>	M	Jovem	MJ	Doença	3	Positivo
<i>Gyps fulvus</i>	M	Jovem	MJ	Doença	2	Positivo
<i>Accipiter nisus</i>	M	Jovem	MJ	Trauma contra estrutura	2	Positivo
<i>Accipiter nisus</i>	F	Adulto	FA	Trauma contra estrutura	2	Positivo
<i>Falco tinnunculus</i>	F	Jovem	FJ	Electrocução	3	Positivo
<i>Tyto alba</i>	M	Adulto	MA	Doença	3	Positivo
<i>Falco tinnunculus</i>	M	Adulto	MA	Trauma Desconhecido	2	Positivo
<i>Falco tinnunculus</i>	M	Jovem	MJ	Trauma Desconhecido	0	Positivo
<i>Bubo bubo</i>	F	Adulto	FA	Electrocução	3	Positivo
<i>Bubo bubo</i>	F	Adulto	FA	Electrocução	4	ND
<i>Accipiter gentilis</i>	F	Jovem	FJ	Electrocução	3	ND
<i>Falco tinnunculus</i>	M	Adulto	MA	Trauma Desconhecido	2	ND
<i>Accipiter nisus</i>	F	Jovem	FJ	Trauma Desconhecido	0	ND
<i>Bubo bubo</i>	F	Jovem	FJ	Doença	2	ND
<i>Gyps fulvus</i>	F	Jovem	FJ	Doença	2	ND
<i>Athene noctua</i>	M	Adulto	MA	Doença	1	ND
<i>Falco tinnunculus</i>	M	Adulto	MA	Doença	3	ND
<i>Buteo buteo</i>	F	Adulto	FA	Disparo	4	ND
<i>Accipiter gentilis</i>	F	Jovem	FJ	Disparo	4	ND
<i>Falco tinnunculus</i>	M	Jovem	MJ	Trauma Desconhecido	4	ND
<i>Accipiter gentilis</i>	F	Jovem	FJ	Doença	2	ND
<i>Accipiter nisus</i>	M	Jovem	MJ	Doença	1	ND
<i>Tyto alba</i>	F	Adulto	FA	Trauma Desconhecido	1	ND
<i>Accipiter nisus</i>	M	Adulto	MA	Disparo	3	ND
<i>Tyto alba</i>	F	Adulto	FA	Doença	0	ND
<i>Asio otus</i>	F	Adulto	FA	Trauma contra estrutura	1	ND
<i>Falco tinnunculus</i>	M	Adulto	MA	Trauma Desconhecido	5	ND
<i>Circus pygargus</i>	M	Jovem	MJ	Trauma Desconhecido	1	ND
<i>Milvus milvus</i>	M	Adulto	MA	Trauma Desconhecido	2	ND
<i>Strix aluco</i>	F	Adulto	FA	Atropelo	3	ND
<i>Strix aluco</i>	M	Adulto	MA	Atropelo	3	ND
<i>Accipiter nisus</i>	F	Jovem	FJ	Doença	0	ND
<i>Tyto alba</i>	F	Jovem	FJ	Trauma Desconhecido	2	ND
<i>Asio otus</i>	F	Adulto	FA	Trauma Desconhecido	3	ND
<i>Bubo bubo</i>	M	Adulto	MA	Electrocução	3	ND
<i>Bubo bubo</i>	M	Adulto	MA	Electrocução	3	ND
<i>Buteo buteo</i>	M	Jovem	MJ	Electrocução	3	ND
<i>Buteo buteo</i>	F	Adulto	FA	Electrocução	2	ND
<i>Buteo buteo</i>	M	Adulto	MA	Electrocução	4	ND
<i>Falco tinnunculus</i>	M	Adulto	MA	Electrocução	2	ND
<i>Falco tinnunculus</i>	F	Adulto	FA	Electrocução	3	ND
<i>Falco tinnunculus</i>	F	Adulto	FA	Electrocução	5	ND